

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192714 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.18

(22) Дата подачи заявки
2020.03.30

(51) Int. Cl. G01N 1/28 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
B25F 1/04 (2006.01)
A61B 17/16 (2006.01)
B26B 13/04 (2006.01)

(54) СИСТЕМА И СПОСОБ ИЗВЛЕЧЕНИЯ И КРИОКОНСЕРВАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА

(31) 62/834,087; 62/938,480; 16/734,713

(32) 2019.04.15; 2019.11.21; 2020.01.06

(33) US

(86) PCT/US2020/025778

(87) WO 2020/214400 2020.10.22

(71) Заявитель:
ОССИУМ ХЕЛС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Вудс Эрик Дж., Джонстоун Брайан Х.,
Гу Дуншэн, Шерри Обри Мэри,
Мьюсалл Келси Гвен, Вудс Джон Р.,
Хардин Джэймс, Хукс Алан (US)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Пармонова К.В.,
Джермакян Р.В., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.
(RU)

(57) Предлагаются способы извлечения клеток костного мозга из кости, полученной от посмертных доноров, подготовки костного мозга к криоконсервации и получения желаемых клеток из криоконсервированного и свежего костного мозга.

Стадия процесса



202192714 A1

202192714 A1

СИСТЕМА И СПОСОБ ИЗВЛЕЧЕНИЯ И КРИОКОНСЕРВАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА

Описание

Притязание на приоритет и ссылка на родственную заявку

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с совместно рассматриваемой заявкой США № 16/734713, поданной 6 января 2020 г., предварительной заявкой США № 62/834087, поданной 15 апреля 2019 г. под названием «System and Method for Collecting and Preserving Bone Marrow for Clinical Use», и с совместно рассматриваемой предварительной заявкой США № 62/938480, поданной 21 ноября 2019 г. под названием «System and Method for Extraction and Cryopreservation of Bone Marrow». Все раскрытия всех трех заявок в явном виде включены в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

В настоящее время костный мозг для клинических целей получают от НЛА-совместимых братьев и сестер или оптимально совместимых неродственных доноров. В настоящее время используются и другие источники трансплантата, включая несовместимых идентичных по гаплотипу родственных или неродственных доноров и пуповинную кровь (СВ). При трансплантации пациентам с определенными заболеваниями гемопоэтические стволовые клетки (HSC) из донорского костного мозга приживаются в организме пациента и восстанавливают иммунную и кроветворную системы.

Костный мозг также является подходящим источником мезенхимальных стромальных/стволовых клеток (MSC), которые представляют собой самообновляющиеся, мультипотентные клетки-предшественники с мультилинейным потенциалом дифференцировки в типы клеток мезодермального происхождения, такие как адипоциты, остециты и хондроциты. Кроме того, MSC могут мигрировать в места воспаления и оказывать мощное иммуносупрессивное и противовоспалительное действие посредством взаимодействий между лимфоцитами, связанными с врожденной и адаптивной иммунной системой.

В настоящее время костный мозг обычно собирается через отверстие в кортикальной кости с помощью троакарной иглы, а затем с помощью иглы для аспирации костного мозга и шприца для забора костного мозга в шприц. Для извлечения всего костного мозга из кости обычно требуется несколько шприцев. Затем шприцы удаляются из стерильного поля, каждый шприц подсоединяется к сборному пакету, содержащему антикоагулянты, и

костный мозг выдавливается в пакет. Эта стадия повторяется много раз, обычно в обеих тазовых костях, и может привести к загрязнению аспирата.

Шестьдесят лет назад было признано, что находящийся на хранении в банке цельный костный мозг (BM) от посмертных доноров также является очень жизнеспособным источником HSC. Получение высокофункционального BM от посмертных доноров органов концептуально схоже с закупкой органов и тканей, которая происходит уже несколько десятилетий, что привело к более чем 30000 трансплантаций органов и 1 миллиону трансплантаций тканей, выполняемых каждый год только в США. HSC костного мозга более выносливы, чем чувствительные органы и большинство тканей, поскольку эти клетки естественным образом эволюционировали для проживания в гипоксической среде в нише BM и, таким образом, способны выдерживать длительные периоды ишемии. HSC обычно находятся в состоянии покоя (G0), поэтому им требуется немного метаболических субстратов и они производят мало отходов. Было установлено, что CD34+ HSC и предшественники в BM посмертных доноров органов обладают высокой жизнеспособностью. Опубликованные значения жизнеспособности CD34+ клеток, выделенных из BM доноров органов (даже при неоптимизированных и не валидированных процедурах извлечения и обработки), составили 95,2% по сравнению с 93,5% для BM прижизненных доноров. Посмертные доноры органов являются богатым источником жизнеспособных клеток BM и статистически неотличимы от прижизненных доноров по показателям жизнеспособности CD34+ и общего количества ядросодержащих клеток (TNC). Более высокий выход CD34+ HSC и большие объемы BM от доноров органов позволяют проводить хранение в банке нескольких единиц BM (>2 единиц при $\sim 2 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг, из расчета на пациента весом 70 кг) для трансплантации нескольким реципиентам, а также дают уверенность в возможности повторной трансплантации в случае отказа первичного трансплантата.

Тем не менее, многочисленные препятствия мешают широкому использованию трупного костного мозга. Одним из значительных препятствий является поиск упорядоченного процесса контролируемого извлечения и консервации костного мозга посмертного донора и выхода клеток из этого костного мозга. Современная передовая практика извлечения BM из мертвых доноров органов включает множество ручных стадий, требующих участия нескольких квалифицированных операторов. Обычно тела позвонков (VB) извлекаются хирургом-трансплантологом и первоначально очищаются в операционной перед транспортировкой в лабораторию обработки, где они снова тщательно очищаются, чтобы удалить все остатки жесткой соединительной ткани перед дальнейшими стадиями обработки. Далее VB обрабатываются группами по 3: сначала кость вручную

разрезается на кубики, а затем кубики подаются в систему для измельчения костей. Затем измельченная кость многократно перемешивается и промывается, а клетки окончательно концентрируются путем центрифугирования. Поскольку за один раз можно обработать не более 3 VB, эта процедура должна повторяться три раза для каждого донора. Этот полностью ручной текущий процесс, как правило, требует 40 часов общего труда с почти 11 часами времени обработки, при типичной стоимости более 10000 долларов на одного донора.

Еще одна проблема, связанная с использованием трупной кости, касается криоконсервации, хранения в банке и восстановления кости. В частности, речь идет о качестве жизнеспособных клеток, таких как HSC, которые могут быть получены из донорской кости, особенно для костей, извлеченных в географически разбросанных местах и прошедших большие расстояния в криохранилище. Каждая стадия процесса извлечения кости из посмертного донора включает ишемию, или обеспечение недостатка кислорода для клеток костного мозга. Известно, что вариации времени теплой и холодной ишемии могут влиять на качество HSC и клеток-предшественников, полученных из трупной кости. Существующие в США рекомендации по хранению в банке тканей позволяют извлекать ткани из посмертных доноров в течение 24 часов после асистолии при условии, что тело охлаждается в течение 12 часов после остановки сердца. Однако охлаждение тела – это переменная, которая не изучалась систематически в отношении извлечения костного мозга. Существует необходимость в способе определения пределов толерантности к теплой и холодной ишемии, превышение которых, вероятно, сделает качество и функциональность извлеченных клеток неприемлемыми для терапевтического использования.

Сущность настоящего изобретения

Системы и способы, раскрытые в настоящем документе, обеспечивают необходимое дополнение к существующим источникам костного мозга и стволовых клеток. Как правило, менее половины пациентов, ожидающих алло-ТКМ, получают трансплантат. Реестр прижизненных доноров ВМ, криоконсервация и аутотрансплантация ВМ, а также хранение пуповинной крови спасли жизни тысячам пациентов с гематологическими заболеваниями; однако эти способы все еще страдают от серьезных ограничений, связанных с поставками и логистикой, и могли бы выиграть от этого ценного дополнения. Кроме того, хотя и редко, но неблагоприятные события возможны при донорстве костного мозга от прижизненного донора (например, риск смерти, связанный с донорством костного мозга, составляет 1:10 000), и хотя донорство стволовых клеток периферической крови в настоящее время используется гораздо шире, почти все доноры будут испытывать боль в костях, у 1 из 4

будет значительная головная боль, тошнота или цитратная токсичность, а у 1 из 5000 произойдет разрыв селезенки или другое смертельное осложнение. Кроме того, долгосрочные последствия применения мобилизующих стволовые клетки агентов пока не известны. Техническая осуществимость хранения в банке и донорства трупного ВМ была продемонстрирована в принципе, однако эти обширные альтернативные запасы в настоящее время отбрасываются из-за проблем, непосредственно решаемых настоящим изобретением.

Хранение ВМ в банке, как раскрыто в настоящем документе, обеспечивает готовый механизм для подбора донора для многих пациентов, которые не могут найти прижизненного донора. Это может значительно увеличить показатели выживаемости после трансплантации для многих пациентов с быстро прогрессирующими заболеваниями и плохим прогнозом, позволяя проводить трансплантацию по требованию и сокращая время ожидания для таких пациентов с многих месяцев до всего 1–2 дней. И что важно, этот подход позволяет получить большое количество ВМ от каждого донора, достаточное для приживания гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC) для нескольких пациентов и позволяющее немедленно повторить трансплантацию ВМ при необходимости.

Способы и системы, раскрытые в настоящем документе, позволяют создавать большие запасы костного мозга по требованию для обеспечения готовности к чрезвычайным ситуациям на национальном уровне. Острая неудовлетворенная потребность в трансплантации костного мозга и стволовых клеток по требованию в качестве медицинской контрмеры на случай ядерных аварий или атак была хорошо документирована NHS, многомиллиардным проектом Project Bioshield от BARDA и Министерством обороны. Настоящее раскрытие также предусматривает необходимый костный мозг для новых применений, таких как стимуляция иммунной толерантности и другие. Протокол обработки и фактического хранения в банке ВМ от доноров органов в течение длительных периодов времени имеет решающее значение для этого подхода. Кроме того, пациенты, которым сегодня трансплантируют органы посмертных доноров, могут воспользоваться этой терапией, когда она станет доступной в будущем, если КМ от этих доноров будет храниться в банке, что сразу делает этот способ полезным для реципиентов жизненно важных органов. В случае успеха другие перспективные способы и методы лечения, находящиеся в стадии исследования, могут значительно повысить ценность заготовки и хранения трупного ВМ с использованием предлагаемого способа, включая трансплантацию ВМ от HLA-несовместимого неродственного донора (mMUD), что сделает большие запасы хранящегося в банке костного мозга пригодными для

немедленного использования большинством реципиентов, нуждающихся в быстрой трансплантации ВМ, особенно для лечения тяжелых форм аутоиммунных заболеваний, генетических заболеваний, рассеянного склероза и диабета 1 типа.

В одном аспекте предлагается способ получения клеток костного мозга из кости посмертного донора, который предусматривает следующие стадии: получение кости от посмертного донора; очистка кости от мягких тканей; измельчение кости на кусочки кости; фильтрация и промывка измельченной кости для получения жидкой композиции; центрифугирование жидкой композиции отфильтрованной и промытой измельченной кости для концентрирования клеток костного мозга; и извлечение клеток костного мозга в стерильный контейнер для криоконсервации и последующего выделения целевых клеток.

В еще одном аспекте предлагается инструмент для резки кости для использования при подготовке кости к измельчению описанным выше способом. Инструмент для резки кости содержит две рукоятки, ножевой элемент и храповой механизм для введения ножевого элемента в кость, в котором компоненты соединены друг с другом удлиненными штифтами, проходящими через отверстия в соответствующих компонентах. Штифты удерживаются с возможностью извлечения по меньшей мере одним съемным стопорным кольцом таким образом, что инструмент для резки кости может быть легко разобран для очистки и снова собран после очистки. Инструмент для резки кости изготовлен из медицинской нержавеющей стали с поверхностями, которые пассивированы, чтобы выдерживать условия стерилизации.

В другом аспекте предлагается способ извлечения клеток из костного мозга посмертного донора, предусматривающий следующие стадии: получение кости от посмертного донора; обработка кости для извлечения клеток костного мозга из кости; получение раствора фикола пониженной плотности с плотностью 1,063–1,052 г/мл; введение раствора фикола пониженной плотности в центрифужную пробирку для создания градиента фикола; наслаивание извлеченных клеток костного мозга на градиент фикола в центрифужной пробирке; центрифугирование пробирок, содержащих градиент фикола и клетки костного мозга; сбор клеток лейкоцитарной пленки из центрифужных пробирок; и промывание собранных клеток для последующего использования или обработки.

Описание фигур

На **фиг. 1A–1D** показаны виды ручного инструмента для резки кости согласно одному аспекту настоящего изобретения.

На фиг. 2 показан вид системы фильтрации согласно одному аспекту настоящего изобретения.

На фиг. 3 показан вид стерильного пакета, содержащего осадок костного мозга, обработанный в соответствии со способами согласно настоящему изобретению.

На фиг. 4 показан вид стерильного пакета, изображенного на **фиг. 3**, с зажимом, прикрепленным к пакету для отделения жира от осадка костного мозга.

На фиг. 5 показана установка для выделения осадок костного мозга.

На фиг. 6 показан вид в перспективе охладительного контейнера согласно одному аспекту настоящего изобретения.

На фиг. 7 показана блок-схема стадий одного способа согласно настоящему изобретению.

На фиг. 8А и 8В показаны вид сбоку и вид в перспективе автоматизированной системы обработки костей согласно одному аспекту настоящего изобретения.

На фиг. 9А и 9В показаны виды в перспективе станции очистки костей системы, показанной на **фиг. 78А–8В**.

На фиг. 10А и 10В показаны вид в перспективе и вид спереди станции измельчения костей системы, показанной на **фиг. 8А, 8В**.

На фиг. 11 показан вид в перспективе станции просеивания системы, показанной на **фиг. 8А, 8В**.

На фиг. 12А–12С показаны таблицы жизнеспособности CD34+ клеток в зависимости от времени теплой и холодовой ишемии, без и с охлаждением организма.

На фиг. 13А–13С показаны таблицы общего количества КОЕ в зависимости от времени теплой и холодовой ишемии, с и без охлаждения организма.

На фиг. 14А–14С показаны таблицы общего количества КОЕ в зависимости от времени теплой и холодовой ишемии, с и без охлаждения организма.

На фиг. 15 показан график порога жизнеспособности в зависимости от времени тепловой ишемии и времени холодовой ишемии.

Подробное описание настоящего изобретения

Для пояснения принципов настоящего изобретения далее будет сделана ссылка на варианты осуществления, изображенные на фигурах и изложенные в следующем описании. Подразумевается, что объем настоящего изобретения не ограничивается ими. Кроме того, подразумевается, что настоящее изобретение включает любые изменения и модификации изображенных вариантов осуществления и включает дальнейшее применение раскрытых в

настоящем документе принципов, как это будет очевидно специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение.

В настоящем изобретении предлагается клинически ориентированный протокол исследования и система, которая модифицирована для реализации в промышленном контексте в современных чистых комнатах. Один из аспектов раскрытой системы включает, помимо прочего, очистку поступающей донорской кости, начальную фрагментацию с помощью изготовленных на заказ хирургических кусачек из нержавеющей стали и измельчение фрагментированной кости до размеров фрагментов ~3 мм. Эти усовершенствования обеспечивают систему, в которой квалифицированные специалисты по обработке тканей могут обрабатывать наборы донорских костей в течение 6 часов, чтобы получить значительное количество жизнеспособного костного мозга.

Первой стадией в описанном в настоящем документе процессе является оценка потенциальных источников костного мозга посмертного донора. При обработке длинных костей от донора, таких как большеберцовая кость, было обнаружено, что из-за преобразования красного костного мозга в желтый с возрастом, красный костный мозг ограничен концами длинных костей и значительно варьируется от донора к донору. Также было установлено, что смешанный желто-красный костный мозг характеризуется низким качеством по сравнению с полностью красным костным мозгом, например, костным мозгом из тел позвонков или подвздошной кости, а смешанный желто-красный костный мозг содержит жировой инфильтрат, который затрудняет последующие стадии обработки. Лучшая донорская длинная кость в некоторых клинических экспериментах давала только $1/100^{10}$ часть клеток ВМ/кг по сравнению с клетками, полученными из тазовых костей того же донора. Таким образом, было установлено, что обработку длинной кости предпочтительно проводить только в особых случаях, например, при использовании особо ценных «универсальных» типов HLA или костного мозга с устойчивой к ВИЧ мутацией дельта 32.

Напротив, тело позвонка и подвздошная кость представляют собой самые большие постоянные резервуары высококачественного красного костного мозга. Использование обоих источников позволило оптимизировать извлечение костного мозга, особенно при реализации промышленного масштабируемого GMP процесса, раскрытого в настоящем документе. Завершение процесса, раскрытого в настоящем документе, приводит к криоконсервации конечной конфигурации продукта с хранением 60–70 мл объема при целевом уровне 100–150 миллионов TNC/мл в стандартных пакетах для крови, аналогично конфигурации продукта, уже используемой для криоконсервированного ВМ для аутологичной трансплантации.

Подготовка донорской кости

Для целей иллюстрации предполагается, что донорской костью являются тела позвонков. Однако понятно, что описанные в настоящем документе способы могут быть использованы на подвздошной кости, комбинации тел позвонков и подвздошной кости или других костях, подходящих для извлечения костного мозга и клеток из костного мозга, даже на донорских костях с более низким ожидаемым выходом.

Подразумевается, что донорские кости могут быть получены в соответствии с фиксированными протоколами клинического извлечения. Кости могут быть извлечены хирургами или персоналом обученной ОРО (организации трансплантационной координации) с помощью остеотома и хирургического молотка у давших согласие доноров органов и тканей. Необработанные кости предпочтительно заворачивают в губки и полотенца, смоченные в физиологическом растворе, чтобы обеспечить сохранение влаги во время гипотермической транспортировки на мокром льду при температуре от 0 до 10°F на обрабатывающую установку.

Процесс подготовки донорской кости может происходить вскоре после получения кости от посмертного донора или после того, как донорская кость была доставлена в гипотермической среде на обрабатывающую установку. Поскольку донорская кость может испытывать длительные периоды ишемии во время извлечения и транспортировки на обрабатывающую установку, необходимо следить за продолжительностью и типом ишемии, т. е. тепловой и холодовой ишемии. Как более подробно описано в данном документе, кости, подвергнутые заранее определенным периодам тепловой и/или холодовой ишемии, подходят для получения значимых количеств жизнеспособных клеток костного мозга.

На первой стадии обработки донорской кости кость очищается в среде ISO-5 (класс 100) (бокс биологической безопасности) с фоном ISO-7 (класс 10000) (чистая комната), при этом особое внимание уделяется стерилизации пакета, содержащего донорскую кость, например, путем опрыскивания 70% изопропанолом. Согласно одному варианту осуществления очистка проводится вручную с использованием скальпелей, остеотомов и желобоватых долот. При обработке позвонков, как правило, предоставляется сегмент позвоночника, содержащий несколько уровней позвонков. В типичном случае сегмент позвоночника проходит от T8 до L5, что составляет десять тел позвонков. Во время первоначальной очистки сегмента позвоночника, когда удалено достаточно мягких тканей для визуализации ножек, ножки удаляются с помощью ленточной пилы для обработки тканей или костной пилки, такой как Stryker System 6 Saw (Stryker, Каламазу, Мичиган). Особое внимание уделяется тому, чтобы не нарушить кортикальную кость, которая

обнажает губчатую кость, чтобы гарантировать, что гипоксический губчатый костный мозг остается защищенным на протяжении всего процесса очистки. Передний элемент тел позвонков остается, а ножки и задние элементы отбрасываются.

С помощью обвалочного ножа или ленточной пилы для обработки тканей тела позвонков разделяются на межпозвоночные диски. Межпозвоночный диск и мягкие ткани, оставшиеся на каждом теле позвонка, удаляются скальпелем, ножницами и/или остеотомами, оставляя чистые, разделенные VB. В случае донорской подвздошной кости мягкие ткани могут быть удалены с помощью желобоватых долот и скальпеля, с особой осторожностью, чтобы не нарушить кортикальную кость. Любые анатомические патологии или травмы кости отмечаются и записываются как часть протокола партии костного мозга, в конечном итоге полученного из костей. Кости, поврежденные в процессе извлечения, отбрасываются.

VB помещают в стерильный пакет и погружают в 10%-ный раствор отбеливателя, дающий концентрацию свободного хлора 5000 ppm, на заранее определенный период времени, обычно 10–25 минут. Отбеливатель обладает широким спектром антимикробной активности, не оставляет токсичных следов, не зависит от жесткости воды и быстро действует. По окончании этого периода кости переносят в другой стерильный пакет и погружают в 3%-ный раствор перекиси водорода (H_2O_2). Пакет закрывают и коротко встряхивают, чтобы вся поверхность кости была в контакте с раствором. Большинство живых клеток содержат каталазу – фермент, катализирующий распад H_2O_2 на H_2O и O_2 . Этот распад проявляется в виде пены или пенного продукта, когда раствор H_2O_2 контактирует с мягкими тканями, но не с костью. Уровень пены можно наблюдать как индикатор количества мягких тканей, оставшихся на кости. Это наблюдение может быть выполнено вручную человеком или, в другом варианте осуществления, автоматизированным процессором. Автоматизированный процессор содержит устройство визуализации, например, камеру, и программное обеспечение для распознавания объектов, которое может определять уровни пены в пакете. Добавление инертного контрастного красителя может помочь человеку или автоматизированному процессору определить уровень пены. Если наблюдается какая-либо пена или пенный продукт, кость возвращается для дальнейшей обработки, чтобы удалить все оставшиеся мягкие ткани из кости.

После того как VB или подвздошная кость будут очищены от всех мягких тканей, кости переносятся в новый стерильный пакет. Пакет заполняется 1 л PLASMA-LYTE™ (инъекция с несколькими электролитами, полученная от Baxter Healthcare, Ltd.) или другим подходящим стерильным непирогенным изотоническим раствором. Пакет закрывают и коротко встряхивают, чтобы вся кость была в контакте с PLASMA-LYTE™.

Извлечение костного мозга

Кость извлекается из пакета и из PLASMA-LYTE™, и используется стерильная марля или губка для впитывания жидкости, оставшейся на VB. В одном из подходов пила и/или костотомы используются для разрезания VB на более мелкие кусочки, например, 1,5 см², которые достаточно малы для фрагментации с помощью костедробилки. Для упрощения процесса и повышения безопасности для обрабатывающего персонала предусмотрен специальный инструмент **100** для резки кости, как показано на **фиг. 1A–1D**, который используется для разрезания VB на мелкие кусочки. Инструмент **100** для резки кости содержит ножевой элемент **102** с режущей кромкой **102a**, выполненной с возможностью проникновения и разрезания кости. Ножевой элемент **102** шарнирно соединен на шарнире **105** с неподвижным компонентом **104** рукоятки. Неподвижный компонент **104** рукоятки содержит зажимной конец **104a**, который прилегает к режущей кромке **102a** для разрезания кости, удерживаемой в зажимном конце. Как показано на **фиг. 1B**, неподвижный компонент рукоятки содержит две пластины **104d**, которые расположены на расстоянии друг от друга для размещения ножевого компонента между ними, как лучше показано на **фиг. 1B–1D**. В частности, режущая кромка **102a** проходит между двумя пластинами **104d** на зажимном конце **104a**, что обеспечивает прохождение режущей кромки **102a** через кость, захваченную зажимным концом **104a**. Зажимной конец **104a** может содержать два углубления **104c**, разделенных гребнем **104b**, который зацепляет кость и помогает удерживать кость в зажимном конце, когда режущая кромка **102a** проходит через кость. Альтернативно в зажимном конце может быть выполнено одно углубление, предназначенное для удержания кости. Шарнир **105** выполнен в виде штифта, который проходит через две пластины **104d** и ножевой компонент **102**, расположенный между пластинами.

Инструмент **100** для резки кости содержит нажимную рукоятку **107**, которая шарнирно прикреплена к неподвижной рукоятке **104** на шарнире **109**. Шарнир может содержать смещающий элемент, например, торсионную пружину (не показана), выполненную с возможностью смещения нажимной рукоятки **107** в сторону от неподвижной рукоятки **104**. Таким образом, нажимная рукоятка выполнена с возможностью поворота в сторону неподвижной рукоятки, когда пользователь удерживает и сжимает две рукоятки, а затем поворота в сторону от неподвижной рукоятки, когда пользователь ослабляет захват рукояток. Следует понимать, что нажимная рукоятка **107** образована из двух пластин **107a**, причем неподвижная рукоятка **104** зажата между двумя пластинами **107a** на шарнире **109**. Как и в случае с шарниром **105**, шарнир **109** выполнен в виде штифта, который проходит через две пластины **107a** и через неподвижную рукоятку

104. Обе рукоятки **104**, **107** содержат соответствующие захватные пластины **106**, **108**, которые обладают формой, удобной для захвата ладонью и пальцами пользователя. Захватные пластины **106**, **108** соединяют пары пластин **104d**, **107a**, которые образуют две рукоятки. Поверхности захватных пластин могут содержать противоскользкий компонент для облегчения захвата инструмента.

Нажимная рукоятка **107** содержит собачку **112**, которая шарнирно прикреплена на шарнире **113** к нажимной рукоятке. Как и другие шарниры, шарнир **113** представляет собой штифт, который проходит через пару пластин **107a**, образующих нажимную рукоятку **107**, и через конец собачки **112**. Шарнир **113** содержит смещающий элемент, например, торсионную пружину (не показана), которая смещает собачку **112** в сторону храпового компонента **110** ножевого элемента **102**. Конец собачки **112** выполнен с возможностью зацепления с зубцами **110a** храпового компонента **110** для вращения храпового компонента и, следовательно, ножевого элемента **102** в направлении против часовой стрелки, как показано на **фиг. 1А**. В частности, когда пользователь сжимает обе рукоятки, нажимная рукоятка **107** перемещается к неподвижной рукоятке **104**, которая толкает собачку **112** вверх к зубцу **110a** храпового колеса, чтобы повернуть храповое колесо вверх и против часовой стрелки. Когда пользователь отпускает нажимную рукоятку, рукоятка перемещается в сторону от неподвижной рукоятки, заставляя собачку **112** скользить вниз по храповому колесу по часовой стрелке, пока она не достигнет другого зубца **112a**. Повторное сжатие двух рукояток, таким образом, заставляет собачку последовательно поворачивать храповое колесо. Ножевой элемент **102** также содержит встроенную тягу **103**, которая шарнирно соединена со свободной тягой **114** на шарнире **116**. Свободная тяга **114** шарнирно соединена с нажимной рукояткой **107** на шарнире **115**. Встроенная тяга **103** и свободная тяга **114** удерживают ножевой элемент **102** в положении, когда собачка перемещается по храповому компоненту **110**. Шарнир **115** свободной тяги представляет собой штифт, как и другие шарниры, и содержит смещающий элемент, например, торсионную пружину (не показана), которая смещает нажимную рукоятку **107** в сторону от неподвижной рукоятки **104**. Это позволяет пользователю закрывать и отпускать рукоятки инструмента для последовательного продвижения собачки **112** вдоль храпового компонента **110**, который последовательно продвигает режущую кромку **102a** в кость.

В одном аспекте инструмента **100** для резки кости согласно настоящему изобретению шарниры **103**, **109**, **113** и **115** выполнены таким образом, чтобы обеспечить полную разборку инструмента. Полная разборка важна для того, чтобы инструмент можно было полностью очистить и стерилизовать между сеансами использования. Таким образом, каждый из шарниров содержит конструкцию из штифта и стопорного кольца, причем

стопорное кольцо удерживает компоненты вместе на штифте. Таким образом, как показано на **фиг. 1D**, штифт **121** может проходить через стенки компонента, например, противоположные стенки **107a** нажимной рукоятки **107** и через соответствующее отверстие в соединяемом компоненте, например, ножевом элементе **102**. Стопорные кольца **122** могут входить в пазы **123** на противоположных концах штифта **121**, чтобы удерживать компоненты вместе. Альтернативно один конец штифта может содержать увеличенную головку, при этом стопорное кольцо входит в зацепление с противоположным концом штифта. Когда необходимо очистить и стерилизовать инструмент **100**, все стопорные кольца **122** могут быть удалены, все штифты **121** могут быть удалены, а соединенные компоненты разделены. Таким образом, ножевой элемент **102**, неподвижная рукоятка **104** и нажимная рукоятка **107** отделяются друг от друга так, что каждая поверхность компонентов может быть эффективно очищена.

Элементы инструмента **100** для резки кости изготовлены из медицинской нержавеющей стали. Сталь предпочтительно является закаленной сталью, способной выдерживать усилия, необходимые для разрезания кости. В процессе очистки инструмент подвергается паровой стерилизации, которая может быть вредной для стали. Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения поверхности элементов из нержавеющей стали пассивируются для предотвращения окисления стальных элементов во время стерилизации.

Возвращаясь к стадиям процесса, в частности к стадии извлечения костного мозга, кусочки, полученные с помощью инструмента для резки кости, немедленно помещают в стерильный кувшин и погружают в 300–500 мл среды для измельчения. В одном аспекте настоящей системы и способа в качестве основы среды для измельчения используется PLASMA-LYTE™-A с 10 Ед/мл гепарина, 2,5% человеческого сывороточного альбумина (HSA) и 3 Ед/мл реагента Benzonase® (Merck KGAA Corporation). Гепарин используется в качестве антикоагулянта. HSA обеспечивает источник белка для предотвращения прилипания и адсорбции клеток к поверхностям, а также для удаления реактивного кислорода. Следует отметить, что в обычных средах для измельчения используется ДНКаза, но в настоящем изобретении реагент Benzonase® заменен на реагент DNase™ (Qiagen Sciences LLC). В то время как ДНКаза действует только на ДНК, современная фармацевтическая биотехнологическая обработка полагается на ферменты, которые могут расщеплять все формы ДНК и РНК, а также могут снижать вязкость раствора, в котором суспендированы клетки. Отмечается, что IMDM (среда Дульбекко в модификации Искова) может заменить PLASMA-LYTE™-A, поскольку IMDM подходит для быстро пролиферирующих клеточных культур высокой плотности и идеально подходит для

поддержки Т- и В-лимфоцитов. Также отмечается, что реагент Denarase® (C-Lecta GmbH) эквивалентен реагенту Benzonase® в том же количестве в настоящем процессе. Другой кувшин на 300–500 мл среды для измельчения сохраняют для сбора фрагментов кости после измельчения, и еще один запас приблизительно 100 мл среды для измельчения сохраняют для промывки через дробилку во время процесса измельчения для предотвращения прилипания фрагментов кости к поверхности кувшина измельчающих компонентов.

Электрическая костедробилка или специально изготовленная костедробилка, такая как дробилка компании Bioger Technologies Inc, (Майами, Флорида) может быть использована в среде ISO-5 в чистой комнате ISO-7. Если обрабатываются VB и подвздошная кость от одного донора, типы костей хранятся отдельно. Во время и после процесса измельчения кость все время находится погруженной в среду для измельчения. После того как все фрагменты донорской кости измельчены, камера костедробилки тщательно промывается свежей средой для обработки. Фрагменты кости выгружаются из дробилки в кувшин, содержащий среду для измельчения.

Содержимое кувшина переносится в стерильные пакеты. На следующей стадии содержимое стерильных пакетов фильтруют для извлечения твердых компонентов. Согласно одному варианту осуществления содержимое каждого пакета пропускают через ряд сит из нержавеющей стали. В этом варианте сито № 40 (425 мкм) укладывается поверх сита № 80 (177 мкм), которое располагается над поддоном-ловушкой для приема жидкого содержимого фильтра. Стерильные пакеты, содержащие выходной продукт из дробилки, закручиваются и затем равномерно выливаются на стопку сит или наборы для фильтрации. За процессом фильтрации наблюдают, чтобы убедиться, что не происходит чрезмерного скопления, которое может сигнализировать о наличии мягких тканей или других загрязнений. Фрагменты кости, оставшиеся на поверхности сит, равномерно распределяются на ситах и промываются 250 мл свежей среды для обработки. Согласно одному варианту осуществления для промывки используется среда для измельчения, описанная выше, или PLASMA-LYTE™ с 2,5% HSA. Прошедший через сита продукт костного мозга, который может составлять приблизительно 1000 мл при хорошо проведенном процессе, переносится в стерильные пакеты для последующей обработки и анализа. Содержимое каждого пакета визуально проверяют, чтобы убедиться, что в нем нет видимых фрагментов костей или мягких тканей.

Согласно другому варианту осуществления содержимое каждого пакета пропускают через устройства для фильтрации костного мозга, как показано на **фиг. 2**. Согласно этому варианту осуществления система **150** содержит стойку **154**, выполненную с возможностью поддержки стерильного сборного пакета **152**, который содержит фрагменты кости и среду,

полученную в результате операции измельчения, описанной выше. Стойка содержит подвеску **155** для контейнера, выполненную с возможностью зацепления с крышкой **153** стерильного пакета для подвешивания контейнера. Дно пакета содержит выпускной узел **160**, который содержит предварительный фильтр **162**, выступающий в корпус сборного пакета. Согласно одному конкретному варианту осуществления предварительный фильтр **162** представляет собой 850-мкм фильтр. Фильтр **162** соединен с выпускной трубкой **164**, которая соединена с помощью патрубка **166** контейнера с впускной линией **171** первого инфузионного фильтра **170**. Согласно конкретному варианту осуществления первый инфузионный фильтр представляет собой 200-мкм или 500-мкм фильтр. Выпускная линия **172** первого инфузионного фильтра соединена с впускной линией **176** второго инфузионного фильтра **175**. Второй инфузионный фильтр представляет собой 200-мкм или 500-мкм фильтр. При первом проходе через систему **150** фильтрации оба инфузионных фильтра изначально обладают размером 500 мкм. Затем проводится вторая промывка измельченного материала, при этом оба инфузионных фильтра обладают размером 200 мкм. Такая двухпроходная фильтрация приводит к получению более чистой суспензии и улучшает удаление жира из суспензии. Второй инфузионный фильтр **175** содержит выпускную линию **177**, которая может быть введена в контакт со стерильным пакетом, таким как пакет **152**, для второго прохода фильтрации. При втором проходе через систему выпускная линия **177** второго инфузионного фильтра **175** может быть введена в зацепление с зажимом **181** для контейнера **180** для перекачивания. Контейнер для перекачивания может представлять собой пакет объемом 600–2000 мл для размещения отфильтрованного продукта костного мозга, который может составлять приблизительно 1000 мл при хорошо проведенном процессе.

Для контроля качества небольшое количество костного мозга, например, 0,3 мл, извлекают из стерильного пакета **152** с помощью шприца в месте **157** инъекции и проводят перемешивание переворачиванием перед извлечением образца. Образец может быть проверен гематологическим анализатором, например, гематологическим анализатором Sysmex, для определения содержания TNC (общего количества ядросодержащих клеток) в образце, в качестве индикатора содержания TNC в костном мозге, подвергаемом последующей обработке.

Удаление жира и концентрирование

Продукт костного мозга, полученный на стадии фильтрации, представляет собой по сути жировую эмульсию. Содержание жира в суспензии, полученной в результате описанного выше подхода с фильтрацией через сито, выше, чем содержание жира в суспензии, полученной из двухпроходной системы **150** фильтрации. Однако в обоих

случаях существует необходимость удаления жира из суспензии. Суспензию, полученную в результате стадии фильтрации, извлекают в пакеты 250 мл, которые герметично запаивают с помощью запаивателя магистралей. Пары стерильных пакетов и палочек для тарирования устанавливают в центрифуге так, чтобы отверстия пакетов были направлены вниз, и уравнивают. Для предотвращения смятия пакетов во время центрифугирования используют пластины для компенсации объема. Согласно одному варианту осуществления пакеты центрифугируют при 500xg в течение 15 минут при комнатной температуре для концентрирования клеток, предпочтительно до $2-3 \times 10^8$ /мл. После завершения центрифугирования каждый пакет по отдельности подвешивают на кольцевую стойку. Внутри пакета видны отдельные слои, причем слой жира четко выражен сверху супернатанта, а осадок костного мозга – внизу, как показано на **фиг. 3**. Новый стерильный пакет приваривается к пакету, извлеченному из центрифуги. Клипсу или зажим **190** пакета помещают на пакет чуть ниже слоя жира, как показано на **фиг. 4**, чтобы разжать или сжать пакет под слоем жира. Затем осадок сливают из центрифужного пакета в новый стерильный пакет, при этом зажим пакета препятствует прохождению слоя жира. Осадок перемешивают при сливе, чтобы ресуспендировать весь осадок. После того как примерно половина осадка стечет в новый пакет, трубку закрывают с помощью гемостата или запаивателя магистралей. Затем второй центрифужный пакет припаивают к новому пакету с осадком, и содержимое этого второго центрифужного пакета сливают в новый пакет.

Результатом этой стадии является центрифугирование новых стерильных пакетов, содержащих костный мозг, для удаления жира. Затем эти пакеты с обезжиренным костным мозгом центрифугируют при 500 xg в течение 15 минут при комнатной температуре с использованием пластин для компенсации объема, чтобы предотвратить смятие пакетов. Каждый пакет снимают и подвешивают на кольцевую стойку, к пакету припаивают пакет для отходов, и с помощью плазмоекстрактора удаляют супернатант в пакет для отходов, как показано на **фиг. 5**. Трубку зажимают гемостатом, когда осадок поднимается или расщепляется. Затем трубку запаивают и разрезают для извлечения пакета, содержащего осадок, из пакета для отходов, который выбрасывается. К пакету, содержащему осадок, припаивают соединение Люэра. Осадок из каждого пакета объединяют в объемный пакет с помощью большого шприца. Пакеты, содержащие осадок, промывают в объемном пакете с помощью среды для промывки. Объемный пакет переворачивают несколько раз, чтобы убедиться, что весь осадок ресуспендирован. Небольшое количество обработанного ВМ, например, 0,5 мл, может быть удалено для проведения контрольного тестирования качества на плотность и количество клеток. Образец также может быть оценен на наличие антигенов лейкоцитов человека, мутации CCR5delta 32 и аполипопротеина (APOE), среди прочего.

Криоконсервация костного мозга

Предполагается, что каждый донор костей может дать три или более пакетов костного мозга посредством процесса, описанного выше, из расчета десяти позвонков и подвздошной кости, полученных от донора. Если в конце процесса для данного донора не получено три пакета костного мозга, донор может быть отмечен как потенциально не прошедший общий контроль качества. Предусмотрен заранее определенный объем костного мозга в каждом пакете, например 70 мл, содержащийся в пакетах объемом 250 мл. Этот заранее определенный объем используется для расчета объема компонентов среды для замораживания, необходимой для эффективного криоконсервирования осадка костного мозга. Среда для замораживания представляет собой раствор среды для промывки и криоконсервирующей композиции. Криозащитная композиция может быть проницаемой средой, такой как диметилсульфоксид (DMSO); 1,2-пропандиол; этиленгликоль; глицерин; форамид; этандиол или бутан-2,3-диол; и/или непроницаемой средой, такой как гидроксиэтилкрахмал (HES), декстран, сахароза, трегалоза, лактоза, раффиноза, рибитол, маннитол или поливинилпирролидон (PVP). 2,5% HSA также обеспечивает криозащиту за счет онкотического давления, стабилизации белков клеточной поверхности и удаления реактивного кислорода. Согласно предпочтительному варианту осуществления среда для криоконсервации представляет собой DMSO. Среда для промывки может представлять собой электролитную среду, такую как PlasmaLyte, Isolyte, IMDM или другие электролитные растворы, подходящие для инфузии. Среда для замораживания может также содержать концентрации оксиразы для снижения содержания кислорода до уровня ниже атмосферного, например, до уровня менее 3% от атмосферной концентрации. Добавление оксиразы создает гипобарическую композицию, которая может облегчить криоконсервацию.

Среду для замораживания получают путем смешивания криопротектора и среды для промывки в соответствии с рассчитанным общим объемом среды для замораживания, необходимым для объема костного мозга, собранного на предыдущих стадиях. Пакет, содержащий костный мозг, помещают на качающуюся платформу для перемешивания, и среду для замораживания вводят в пакет с помощью шприца. Среду для замораживания вводят с определенной скоростью в течение заранее определенного времени. Согласно одному варианту осуществления среду для замораживания добавляют со скоростью 10% среды в минуту в течение десяти минут. После смешивания среды с концентрированным костным мозгом с помощью шприца извлекают контрольный образец. Оставшуюся смесь среды для замораживания и костного мозга вводят в заранее определенных количествах в отдельные пакеты для криоконсервации. Согласно одному варианту осуществления 70 мл

смеси костного мозга вводят в каждый пакет для криоконсервации и шприцем вытягивают воздух. В конце процесса можно извлечь 8-мл образец для проверки на стерильность. Каждый пакет для криоконсервации запаивается для создания четырех отсеков, которые затем разделяются для хранения в кассетах для хранения в криоморозильнике. Согласно другому варианту осуществления разделенные отсеки хранятся в контейнере пассивного охлаждения, таком как охлаждающий контейнер **200**, показанный на **фиг. 6**.

Когда контрольные образцы из конкретной партии костного мозга будут проверены на количество клеток и стерильность, пакеты с криоконсервированным костным мозгом могут быть дополнительно охлаждены для долгосрочного хранения. Согласно одному варианту осуществления пакеты охлаждают с контролируемой скоростью для предотвращения повреждения костного мозга и клеток. Согласно одному конкретному варианту осуществления пакеты охлаждают со скоростью от -1 до -40°C в минуту до температуры, подходящей для погружения пакетов в жидкий азот. Подходящая температура находится в диапазоне от -40 до -100°C . После достижения этой температуры пакеты охлаждают дальше с более высокой скоростью до температуры ниже -130°C для хранения. Пакет для криоконсервации помещают в соответствующий отсек **201–203** охлаждающего контейнера **200**, и крышку **205** закрывают над отсеками для обеспечения герметичной среды для криоконсервации содержимого пакетов. Охлаждающий контейнер помещают в криоморозильник таким образом, чтобы в охлаждающем контейнере скорость охлаждения составляла от $-0,5$ до -2 $\text{C}^{\circ}/\text{мин}$, и, как правило, -1 $\text{C}^{\circ}/\text{мин}$, при температуре образования зародышей выше -20°C . Процесс замораживания продолжается с заданной скоростью до тех пор, пока температура костного мозга не достигнет подходящей температуры. Подходящей температурой для хранения пакетов является температура $\leq -80^{\circ}\text{C}$ или $\leq -150^{\circ}\text{C}$.

Согласно другому варианту осуществления пакеты охлаждают при статической температуре в камере в отличие от криоконсервации с контролируемой скоростью, описанной выше. При подходе с пассивным охлаждением охлаждающий контейнер помещают в морозильник с температурой -86°C до тех пор, пока пакеты не достигнут стабильной температуры.

Предполагается, что хранение с криоконсервацией может быть в различных формах. Например, криоконсервированный костный мозг может содержаться в пакетах объемом от 1 мл до 5 мл или флаконах объемом от 0,1 до 15 мл. Согласно предпочтительному варианту осуществления пакеты с костным мозгом объемом 70 мл хранят в охлаждающем контейнере в криогенном морозильнике.

Криоконсервированный костный мозг хранят в криобанке для последующего оттаивания и извлечения нужных клеток. Размороженный костный мозг может быть предоставлен для широкого спектра лечения, включая лечение лейкемии, опухолей мозга, рака молочной железы, болезни Ходжкина, множественной миеломы, нейробластомы, неходжкинской лимфомы, рака крови, рака яичников, саркомы, рака яичек, солидного рака других органов, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, сахарного диабета, кистозного фиброза, болезни Альцгеймера, генетических иммунодефицитных состояний, нарушений обмена веществ, синдромов недостаточности костного мозга и ВИЧ. Костный мозг также может использоваться для стимуляции иммунотолерантности, чтобы уменьшить потенциальное отторжение имплантата, полученного от донора органов. Лечение костным мозгом также может быть показано при поражениях, вызванных радиацией и некоторыми видами биологического оружия.

Костный мозг является хорошо известным источником мезенхимальных стромальных/стволовых клеток (MSC), которые могут быть собраны из костного мозга донора органов и тканей, ранее помещенного в криобанк, с помощью описанных выше способов. MSC представляют собой самообновляющиеся, мультипотентные клетки-предшественники с мультилинейным потенциалом дифференцировки в типы клеток мезодермального происхождения, такие как адипоциты, остеоциты и хондроциты. Кроме того, MSC могут мигрировать в места воспаления и оказывать мощное иммуносупрессивное и противовоспалительное действие посредством взаимодействий между лимфоцитами, связанными с врожденной и адаптивной иммунной системой. MSC могут быть использованы для лечения несовершенного остеогенеза, дефектов хряща, инфаркта миокарда, болезни Крона, рассеянного склероза, аутоиммунных заболеваний, таких как волчанка, цирроз печени, остеоартрит и ревматоидный артрит. Соответствующие единицы HSC/MSC, которые могут быть использованы в совместной трансплантации для лечения болезни «трансплантат против хозяина» (GVHD), а также для поддержки трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Настоящий способ обеспечивает систему для извлечения и хранения в банке костного мозга для будущего клинического использования в соответствии с описанными выше стадиями процесса, как показано на блок-схеме на **фиг. 7**. Этот способ может устранить неудачи существующих способов подбора доноров костного мозга для групп, которые трудно подобрать, например, для некоторых меньшинств. После того как костный мозг криоконсервирован и помещен в банк, нет никакой неопределенности в отношении источника костного мозга, нет необходимости ждать будущего реципиента, и костный мозг доступен в больших воспроизводимых объемах.

Автоматизированная система для извлечения костного мозга

В настоящем раскрытии рассматривается автоматизированный процесс извлечения костного мозга и даже выделения клеток из костного мозга. В одном аспекте автоматизированная система **209** содержит последовательные станции, как показано на **фиг. 8А–8В**. На первой станции **210** автоматизированного процесса происходит очистка VB для удаления всех мягких тканей. В отличие от ручного процесса, при котором обрабатывается одно VB за раз, автоматизированный процесс предусматривает очистку всего набора донорских VB (который может состоять по меньшей мере из десяти тел позвонков). VB устанавливаются на штатив или лоток **212**, который выполнен с возможностью поддержки набора тел позвонков от данного донора. Лоток **212** размещается на направляющих **216** для перемещения корпуса **215**, как показано на **фиг. 9А–9В**, при этом лоток автоматически или вручную продвигается внутрь корпуса. Корпус **215** поддерживает множество гидрофорсунок **220**, которые направляют струи физраствора под высоким давлением и с высокой скоростью на VB. В известном ручном процессе ручная гидрофорсунка, работающая на более низких скоростях и давлениях, направляет поток моющего средства на VB. В ручном процессе моющее средство необходимо для очистки VB от мягких тканей. В отличие от этого, в автоматизированной станции **210** очистки согласно настоящему изобретению используется солевая среда, при этом скорость и давление струй воды достаточны для удаления всех мягких тканей из VB. Автоматическая станция очистки согласно настоящему изобретению содержит форсунки, выполненные с возможностью создания прямого потока или узкой V-образной струи воды/физраствора, которая обеспечивает высокую концентрированную ударную силу на различных расстояниях. Для достижения надлежащего покрытия VB устройство содержит множество прямых форсунок, расположенных на небольшом расстоянии друг от друга при различных ориентациях относительно VB, что обеспечивает равномерную очистку независимо от положения VB в устройстве. Согласно варианту осуществления, изображенному на **фиг. 9А**, гидрофорсунки расположены в верхнем **220** и нижнем ряду **221**. V-образные форсунки выровнены под разными углами для достижения полного покрытия поверхностей VB. Дополнительно или альтернативно гидрофорсунки **220**, **221** могут быть выполнены с возможностью колебания над лотком с VB для обеспечения полного покрытия.

На выходе из станции **210** очистки расположено устройство **225** визуализации, которое может работать для визуализации и интерпретации VB, выходящих из станции, чтобы определить, все ли мягкие ткани были удалены, как показано на **фиг. 9В**. Если нет, то VB возвращаются по направляющим **216** обратно в корпус для дальнейшей гидроструйной обработки. Предполагается, что может быть предусмотрен контроллер (не

показан) для управления перемещением лотка **212** по направляющим **216** и интерпретации сигналов, генерируемых устройством **225** визуализации. Устройство визуализации может содержать камеру, которая получает изображение VB, а контроллер может содержать программное обеспечение для визуализации, способное распознавать мягкие ткани на полученном изображении. В конце процесса гидроструйной очистки на очищенные VB может быть нанесен краситель, при этом краситель поглощается мягкими тканями, но не костью. Таким образом, краситель может обеспечить контрастность для облегчения дифференциации любых оставшихся мягких тканей от кости. Устройство **225** визуализации может быть выполнено с возможностью панорамирования VB, например, путем поступательного перемещения вдоль рамы **226** и поступательного перемещения рамы для просмотра VB под любыми углами.

Снова рассмотрим **фиг. 8А–8В**, после того, как будет установлено, что VB очищены от всех мягких тканей, очищенные VB подаются конвейером **230** на автоматизированную станцию **240** измельчения для получения кусочков соответствующего размера для перемешивания и окончательного извлечения клеток. Описанный выше процесс ручного «нарезания на кубики» может быть изменчивым, занимать много времени и быть потенциально небезопасным для оператора. Автоматизированная система содержит станцию измельчения, которая объединяет стадии «нарезания на кубики» VB (т. е. разрезания VB на мелкие кусочки) и измельчения нарезанных на кубики VB для уменьшения VB до кусочков размером 2–3 мм. Направляющие **216** и лоток **212** могут быть выполнены с возможностью размещения очищенных VB на конвейере **230**, который затем автоматически передает VB во входной бункер **242** станции **240** измельчения, более подробно показанной на **фиг. 10А–10В**. VB направляются через модуль **244** начального дробления, затем через воронку **246** в модуль **248** тонкого дробления, как показано на **фиг. 10А**. Как показано на **фиг. 10В**, модуль **242** начального дробления содержит вращающиеся в противоположных направлениях дробильные вальцы **245**, которые разделены заранее определенным зазором, например, зазором 5–8 мм, вследствие чего поступающие VB измельчаются на сегменты крупного размера. Сегменты крупного измельчения подаются в модуль **248** тонкого дробления, в котором предусмотрены дробильные вальцы **249** меньшего диаметра. Вальцы **249** тонкого измельчения разделены меньшим зазором, порядка 2–3 мм, для получения тонко измельченных сегментов VB. Как показано на **фиг. 10А**, воронка **246** подает сегменты грубого измельчения во вторую мельницу **248**, а воронка **250** направляет сегменты VB тонкого измельчения в сборный поддон **252**, установленный на пластине **253**. Во время операции измельчения измеренный объем среды для обработки/ресуспендирования с ДНКазой может быть направлен через верхний бункер на

измельчители. Эта среда может вводиться вручную во время работы станции **240** измельчения или автоматически через форсунки, встроенные в бункер **242**.

Тонко измельченные сегменты VB и среда для обработки собираются в сборном поддоне **252**, а пластина **253** может быть перемещена на станцию **260** просеивания (**фиг. 8А–8В**) вручную или автоматически. На станции **260** просеивания содержимое поддона **252** попадает в блок сетчатого картриджа, который содержит два фильтрующих сита диаметром 12 дюймов – сито №40 **262** сверху, а затем более тонкое сито №80 **264**, как показано на **фиг. 11**. Воронка **266** направляет отфильтрованное содержимое в сборный контейнер **268**. Измельченные частицы, удерживаемые фильтрами, промываются в станции **260** просеивания с помощью среды для обработки/ресуспендирования, не содержащей ДНКазу. Жидкий продукт костного мозга в сборном контейнере **268** может быть проанализирован для определения содержания клеток, а затем сконцентрирован и упакован в соответствующих объемах для криоконсервации, как описано ниже. Альтернативно часть или весь обработанный костный мозг может быть подвергнут дальнейшей обработке с использованием автоматизированных подходов выделения клеток для специализированных клеточных продуктов, таких как CD34+ клетки. Поскольку при таком подходе можно получить большие объемы клеток от одного донора органов, от одного донора можно получить несколько типов продуктов. Более того, поскольку источником является первичный костный мозг (в отличие от G-CSF-мобилизованной периферической крови), клеточный продукт выдерживает обработку криоконсервацией.

В одной модификации выходной продукт из станции **240** измельчения или станции **260** просеивания может автоматически подаваться в сборный пакет для криогенной обработки. В этой модификации нижняя воронка **250** может быть выполнена с возможностью направления содержимого в линию текучей среды, соединенную со стерильным пакетом. Перистальтический насос может быть подключен к линии текучей среды, чтобы перекачивать выходной продукт из станции измельчения в стерильный пакет. Аналогичное устройство может быть подключено к воронке **266** станции просеивания.

Содержимое сборного контейнера **268**, которое по существу является суспензией костного мозга, подается вручную или автоматически на соседнюю станцию **270** перемешивания, которая содержит механический блок **272** перемешивания и большой одноразовый сосуд **274**, который может вмещать все содержимое десяти обработанных VB и соответствующую среду для обработки/ресуспендирования. Блок **272** перемешивания содержит лопасть для перемешивания измельченной суспензии для механического освобождения клеток. Когда цикл перемешивания завершен, содержимое блока перемешивания выливается через сетчатый картридж в сосуд **274**. Содержимое сосуда **274**

может быть подвергнуто дальнейшей обработке или подготовлено для криогенного хранения.

Выделение клеток из костного мозга

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается способ выделения CD34-экспрессирующих (CD34+) клеток из костного мозга посмертного донора с использованием фиколла с пониженной плотностью и иммуномагнитного набора для выделения CD34+ клеток. Неожиданно было обнаружено, что выделение клеток с использованием фиколла с пониженной плотностью перед выделением CD34 является целесообразным для получения высокой чистоты и жизнеспособности CD45/CD34+ клеток из *свежеполученного* костного мозга посмертного донора. С другой стороны, фиколл с обычной плотностью был признан оптимальным для выделения CD45/CD34+ клеток из *размороженного* криоконсервированного костного мозга посмертного донора.

Позвоночные секции, полученные от недавно умершего донора, обрабатывали, как описано выше. Так, согласно одному варианту осуществления кость очищают от всех мягких тканей и затем нарезают на небольшие кусочки, которые немедленно погружают в 500 мл среды для измельчения. Средой для измельчения может быть изотонический раствор PLASMA-LYTE™ A injection pH 7,4, с несколькими электролитами, тип инъекции 1 USP (PLASMA-LYTE™), содержащий 2,5% человеческого сывороточного альбумина (HSA), 3 Ед/мл денаразы и 10 Ед/мл гепарина. Разрезанные VB измельчают с помощью костедробилки, фильтруют и промывают средой для промывания (например, PLASMA-LYTE™ с 2,5% HSA). Всю клеточную суспензию центрифугируют для концентрирования клеток до $2-3 \times 10^8$ /мл и извлекают клеточную концентрацию. Часть или весь полученный препарат BM может быть сразу использован для выделения CD34, а оставшаяся часть может быть подготовлена для криоконсервации. Криоконсервированная часть предусматривает добавление конечной концентрации 10% DMSO и 5% HSA к клеткам BM и доведение препарата до -86°C либо путем пассивного охлаждения, либо путем контролируемого охлаждения со скоростью приблизительно $-1^\circ\text{C}/\text{мин}$, после чего криоконсервированную часть погружают в жидкий азот.

Для выделения CD34+ клеток используют либо только что обработанный препарат BM, либо размораживают ранее криоконсервированную часть. Фиколл-пак PLUS добавляют к препарату BM для отделения желаемого компонента костного мозга – CD34+ клеток. Было установлено, что для выделения клеток из криоконсервированного костного мозга обычная плотность фиколла 1,077 г/мл дает приемлемые результаты. Однако в одном аспекте настоящего изобретения для выделения клеток из свежеполученного костного мозга посмертного донора плотность фиколла снижена по сравнению с обычной

плотностью. В частности, плотность снижают путем смешивания фиколл-пака PLUS (плотность 1,077 г/мл, GE Company) с изотоническим раствором Plasma Lyte-A Injection pH 7,4 (Baxter Healthcare 2B2544X) в определенных пропорциях для получения общей плотности менее 1,077 г/мл, в частности 1,063–1,052 г/мл. Согласно одному конкретному варианту осуществления плотность 1,063 г/мл была признана оптимальной для выделения CD34+ клеток, принимая во внимание количество, жизнеспособность и чистоту CD34+ клеток.

Согласно одному варианту осуществления 5 мл растворов фиколла плотностью 1,063 г/мл пипетируют в 15-мл центрифужные пробирки, и раствор BM, полученный из VB посмертных доноров, осторожно наслаивают поверх градиента фиколла. Пробирки центрифугируют в течение 30 мин при 400 g без перерыва при комнатной температуре. После центрифугирования клетки лейкоцитарной пленки аккуратно собирают, и клетки промывают в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS), содержащем 0,5% HSA и 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) (буфер MACS, Miltenyi). Согласно одному конкретному варианту осуществления центрифугирование проводят в течение 5 мин при 400 g, и полученные клеточные осадки ресуспендируют в 10 мл PBS, после чего проводят второе центрифугирование в течение 5 мин при 400 g.

Ядродержащие клетки в выделенной лейкоцитарной пленке можно подсчитать с помощью Sysmex XP-300. Для определения количества очищенных CD34 клеток можно использовать Cellometer Vision (Nexcelom) или проточный цитометр. 20 микролитров АОPI можно добавить к 20 микролитрам клеток и после перемешивания определить общее количество жизнеспособных клеток. CD34+ клетки могут быть отобраны способом положительного иммунного разделения с использованием системы CliniMAX (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Германия) или набора EasySep CD34 (Stemcell Technologies, Ванкувер, Британская Колумбия, Канада) в соответствии с протоколом производителя. В результате тестирования при различных плотностях раствора фиколла было неожиданно установлено, что более низкая плотность фиколла, предусмотренная в настоящем изобретении (т. е. 1,063–1,052 г/мл относительно обычной плотности 1,077 г/мл), приводит к более оптимальному извлечению клеток. Оптимизация основана на чистоте, жизнеспособности и выходе отобранных CD34 клеток. Предпочтительным является целевой показатель >90% чистоты и >90% жизнеспособных CD34+ клеток. Хотя более низкая плотность фиколла приводит к большей чистоте и меньшему количеству мертвых клеток, неожиданно было обнаружено, что большая часть CD34+ клеток, присутствующих в цельном костном мозге посмертного донора до выделения, теряется при использовании более низкой плотности раствора фиколла для приготовления лейкоцитарной пленки. Таким образом, высокая

жизнеспособность и чистота CD45/CD34+ клеток, достигаемая при использовании обычного градиента плотности фиколла, также приводит к большой потере выхода (приблизительно 60% потери исходных CD34+ клеток).

Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящего изобретения для свежеприготовленного материала оптимальная плотность фиколла для выделения CD45/CD34+ клеток при >90% чистоте и жизнеспособности составляет менее 1,077 и, в частности, 1,063–1,052. Такая плотность фиколла обеспечивает более высокий выход CD45/CD34+ клеток с аналогичной чистотой и жизнеспособностью клеток по сравнению с обычным подходом к плотности фиколла.

В другом аспекте настоящего изобретения CD34+ клетки могут быть первоначально получены из свежеприготовленного костного мозга посмертного донора с использованием описанного выше фиколл-пака пониженной плотности. ВМ может быть подвергнут криогенной заморозке, а затем CD34+ клетки могут быть получены позже с использованием фиколл-пака обычной плотности. Этот подход по сути позволяет избирательно извлекать клетки из костного мозга посмертного донора – либо до замораживания с использованием фиколла модифицированной плотности, либо после замораживания и оттаивания с использованием фиколла обычной плотности.

Извлечение MSC из обработанного костного мозга

В другой системе и способе, раскрытых в настоящем документе, предлагается способ извлечения мезенхимальных стволовых клеток (MSC) из ферментативно переваренных костных фрагментов тела позвонка (VB), которые являются побочным продуктом стадий измельчения и элюирования VB в способах, описанных в настоящем документе. В этом способе используют смесь коллагеназы и нейтральной протеазы для получения максимально возможного выхода адгезивных MSC позвоночной кости (vBA-MSC). MSC могут быть извлечены из криоконсервированных фрагментов кости VB, которые впоследствии обрабатываются в соответствии с настоящим изобретением. В одном конкретном аспекте рекомбинантная коллагеназа *Clostridium histolyticum*, состоящая из двух активных изоформ, используется в эффективном количестве в процессе извлечения MSC. Смесь клеток, высвобожденных при переваривании костного фрагмента VB, культивируют на покрытом тканью пластике в присутствии среды Mesencult для выделения пролиферативных vBA-MSC. Свежепереваренные препараты, а также различные пассажи VB-MSC могут быть охарактеризованы с помощью проточной цитометрии, потенциала колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф), времени удвоения популяции (PDT) и трехлинейной (адипогенной, хондрогенной и остеогенной) дифференциации *in vitro*.

Таким образом, в настоящем изобретении рассматривается способ оптимизации переваривания и извлечения MSC из фрагментов позвоночной кости с использованием комбинации очищенной коллагеназы и нейтральной протеазы. Согласно одному конкретному варианту осуществления коллагеназа представляет собой коллагеназу DE (Vitacyte), которая состоит из очищенной коллагеназы *Clostridium histolyticum* и нейтральной протеазы *Pancreaticus polymyxa*. В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения определяют оптимальную концентрацию нейтральной протеазы и концентрацию коллагеназы (коллагеназы C1 и C2), а также оптимальное соотношение объема раствора (мл) и веса фрагмента кости (мг).

Согласно процессу фрагменты кости VB помещают в криозащитный раствор, состоящий из PLASMA-LYTE™, 2,5% человеческого сывороточного альбумина и 10% диметилсульфоксида (DMSO), и инкубируют в течение 1 часа при 4°C. Раствор удаляют, а фрагменты кости охлаждают со скоростью ~1°/мин до -86°C и затем погружают в жидкий азот. Через 24–48 часов пребывания в жидком азоте фрагменты кости быстро размораживают на водяной бане при температуре 37°C, затем промывают в физрастворе и переваривают с помощью раствора коллагеназы/протеазы, описанного выше.

Было установлено, что оптимальное соотношение объема и веса составляет 5:1 при оптимальном времени инкубации 2,5 часа. Оптимальная протеаза дает активность нейтральной протеазы 19,6 Ед/мл. С другой стороны, было установлено, что общее количество жизнеспособных клеток MSC в целом не зависит от концентрации коллагеназы. Также было установлено, что выход, полученный с помощью изоформ рекомбинантной коллагеназы C1 и C2, аналогичен выходу с использованием очищенной коллагеназы, независимо от соотношения C1/C2. Более подробную информацию о процессе извлечения MSC согласно настоящему изобретению можно найти в технической статье в Приложении А к настоящей заявке, все раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Прогнозирование жизнеспособности клеток на основе времени ишемии

Как было описано выше, время ишемии донорской кости влияет на жизнеспособность клеток, извлеченных с помощью описанных выше процессов. Согласно настоящему изобретению полная ишемия определяется как интервал времени, начинающийся с момента смерти (момент, когда артериальная система донора была пережата и кровообращение прекратилось) и заканчивающийся началом извлечения клеток из кости. Для целей статистического моделирования этот общий интервал можно разделить на три последовательных и взаимоисключающих временных компонента: (а) *Время тепловой ишемии* (WIT) – начинается в момент смерти и заканчивается либо когда кости

извлекают и укладывают в лед, либо когда тело помещается в холодильник; (b) *время охлаждения тела* (BCT) – начинается когда тело помещают в холодильник и заканчивается когда кости укладывают в лед; и (c) *время холодовой ишемии* (CIT) – начинается когда кости укладывают в лед и заканчивается когда начинается обработка для извлечения клеток, таких как HSPC. Таким образом, общее время ишемии = (WIT) + (BCT) + (CIT). В случаях, когда охлаждение всего тела не используется, BCT равно нулю, а общее время ишемии = (WIT) + (CIT).

Помимо общего времени ишемии, в определение жизнеспособности может быть включена переменная, соответствующая опыту обработки. Известно, что кривые обучения оказывают значительное влияние на результаты, поэтому для контроля этого факта переменная EXP может быть определена как количество доноров, обработанных до текущего донора – т.е. для $i^{\text{го}}$ донора $EXP = i - 1$. Другие переменные могут включать тип кости (например, тела позвонков и подвздошные кости), пол донора и возраст донора.

В одном аспекте переменными результата являются: доля определенной популяции клеток, таких как CD34+ клетки, которые являются жизнеспособными, общее количество колониеобразующих единиц (КОЕ) на 10^5 ядродержащих клеток, обнаруженных после обработки клеток, и количество КОЕ гранулоцитов-макрофагов (КОЕ-ГМ), обнаруженных на 10^5 ядродержащих клеток.

Согласно настоящему изобретению для прогнозирования переменных результата может быть использована обычная бета-регрессионная модель по методу наименьших квадратов (OLS), причем линейные регрессионные модели используются для КОЕ и КОЕ-ГМ, а бета-регрессионная модель используется для доли жизнеспособных CD34+ клеток, или %CD34+, где $0 < (\%CD34+) < 1$. Уравнение бета-регрессии для прогнозирования %CD34+ следующее:

$$(1) \quad \eta = \ln[pCD34^*/(1 - pCD34^*)] \\ = \beta_0 + \beta_1(WIT) + \beta_2(BCT) + \beta_3(BCT^2) + \beta_4(CIT) + \beta_5(CIT^2)$$

где

$pCD34^* \equiv [1 + 100(\%CD34+)]/102$, которое представляет собой преобразование искомой переменной,

β_0 – константа (свободный член уравнения регрессии),

β_1 – коэффициент, связанный с временем тепловой ишемии (WIT),

β_2 – коэффициент, связанный с временем охлаждения тела (BCT),

β_3 – коэффициент, связанный с квадратом времени охлаждения тела (BCT^2),

β_4 – коэффициент, связанный с временем холодовой ишемии (CIT),

β_5 – коэффициент, связанный с квадратом времени холодовой ишемии (CIT^2).

К линейному предиктору η применяется функция обратной связи, так что результатом является ожидаемое значение переменной результата $pCD34^*$, а именно процент жизнеспособных CD34+ клеток, которые, как ожидается, будут извлечены из донорской кости. Обратная функция связи имеет следующий вид:

$$(2) \quad E[pCD34^*] = \frac{\exp(\eta)}{[1 + \exp(\eta)]}$$

или заменяя уравнение (1) выше на η :

$$(3) \quad E[pCD34^*] = \frac{\exp(\eta)}{[1 + \exp(\eta)]} = \frac{\exp[\beta_0 + \beta_1(X_1) + \beta_2(X_2) + \beta_3(X_3) + \beta_4(X_4) + \beta_5(X_5)]}{[1 + \exp(\beta_0 + \beta_1(X_1) + \beta_2(X_2) + \beta_3(X_3) + \beta_4(X_4) + \beta_5(X_5))]}$$

Согласно этому варианту осуществления математическая модель прогнозирует долю жизнеспособных CD34+ клеток, которые могут быть извлечены из донорской кости, подвергнутой определенным условиям ишемии. Значение $E[pCD34^*]$ находится в диапазоне от 0 до 1, поскольку это соотношение количества жизнеспособных CD34+ клеток и общего количества CD34+ клеток в образце кости.

Согласно одному варианту осуществления коэффициенты для расчета бета-регрессии прогнозируемого %CD34+ имеют следующие значения:

$$\beta_0 = 3,5000,$$

$$\beta_1 = -0,01996,$$

$$\beta_2 = -0,181,$$

$$\beta_3 = 0,007,$$

$$\beta_4 = -0,111,$$

$$\beta_5 = 0,002,$$

где каждый из бета-коэффициентов $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5$ соответствует свободному члену уравнения регрессии, WIT, BCT, BCT², CIT и CIT², соответственно, как описано выше.

Прогнозы для общего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) и количества КОЕ гранулоцитов-микрофагов (КОЕ-ГМ) могут быть получены с помощью следующей линейной регрессионной модели:

$$(4) \quad \eta = \beta_0 + \beta_1(WIT) + \beta_2(BCT) + \beta_3(BCT^2) + \beta_4(CIT)$$

Линейная регрессионная модель, используемая для определения переменной результата КОЕ, может иметь следующие значения коэффициентов:

$$\beta_0 = 756,5084,$$

$$\beta_1 = -9,10826,$$

$$\beta_2 = -95,03639,$$

$$\beta_3 = 3,45603,$$

$$\beta_4 = -4,53349,$$

где каждый из бета-коэффициентов $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ соответствует свободному члену уравнения регрессии, WIT, BCT, BCT² и CIT, соответственно, как описано выше.

Линейная регрессионная модель, используемая для определения переменной результата КОЕ-ГМ, может иметь следующий вид:

$$(5) \quad \eta = \beta_0 + \beta_1(WIT) + \beta_2(BCT) + \beta_3(CIT)$$

со следующими значениями коэффициентов:

$$\beta_0 = 104,1805,$$

$$\beta_1 = -8,11295,$$

$$\beta_2 = -5,52927,$$

$$\beta_3 = 0,08872.$$

Вышеуказанные модели являются базовыми или нескорректированными моделями, которые учитывают только переменные, основанные на ишемии, а не переменные в виде опыта, типа кости, пола донора и возраста донора. Полностью скорректированная модель для %CD34+, учитывающая все переменные, может иметь следующий вид:

$$(6) \quad \eta = \beta_0 + \beta_1(Experience) + \beta_2(Bone Type) + \beta_3(WIT) + \beta_4(BCT) + \beta_5(BCT^2) + \beta_6(CIT) + \beta_7(CIT^2)$$

со следующими соответствующими значениями коэффициентов:

%CD34+

β_0 , константа	3,112681
β_1 , опыт	0,0095651
β_2 , тип кости (VB=1)	0,0351495
β_3 , время тепловой ишемии (WIT) (час) ^a	-0,0229737
β_4 , время охлаждения тела (BCT) (час)	-0,176881
$\beta_{5,5}$, квадрат времени охлаждения тела (BCT ²)	0,0062293
β_6 , время холодовой ишемии (CIT) (час)	-0,101344
β_7 , квадрат времени холодовой ишемии (CIT ²)	0,0013874

Полностью скорректированная модель для КОЕ выглядит следующим образом:

$$(7) \quad \eta = \beta_0 + \beta_1(Experience) + \beta_2(Facility \times Experience) + \beta_3(Bone Type) + \beta_4(WIT) + \beta_5(BCT) + \beta_6(BCT^2) + \beta_7(CIT) + \beta_8(CIT^2)$$

КОЕ

β_0 , константа	160,6034
β_1 , опыт	2,60499
β_2 , учреждение x опыт	5,36988

β_3 , тип кости (VB=1)	206,9969
β_4 , время тепловой ишемии (час)	-3,73481
β_5 , время охлаждения тела (час)	-82,49506
β_6 , квадрат времени охлаждения тела	2,95994
β_7 , время холодовой ишемии (час)	9,55975
β_8 , квадрат времени холодовой	-0,12535

ишемии

Коэффициент β_1 предназначен для количественной оценки влияния количества обработанных доноров (т. е. опыта) на количество и жизнеспособность клеток. В полностью скорректированной модели КОЕ коэффициент β_2 соответствует опыту в конкретном учреждении, исходя из предположения, что учреждения могут характеризоваться различными динамиками обучения. Любой из этих коэффициентов или оба могут быть изменены или даже исключены.

КОЕ-ГМ

β_0 , константа	88,3589
β_1 , тип кости (VB=1)	16,71592
β_2 , время тепловой ишемии (час)	-7,19329
β_3 , время охлаждения тела (час)	-5,24410
β_4 , время холодовой ишемии (час)	0,10750

Применяя эти модели к наблюдаемым данным, можно определить влияние переменных времени ишемии на %CD34+, как отражено в таблицах, представленных на **фиг. 12А–12С**, на общее количество КОЕ, как показано в таблицах **фиг. 13А–13С**, и на количество КОЕ-ГМ, как показано в таблицах **фиг. 14А–14С**. Данные в этих таблицах могут быть использованы для принятия решения о том, может ли конкретная донорская кость дать достаточное количество клеток для обеспечения дальнейшей обработки донорской кости. Другими словами, модели прогнозирования могут быть использованы для установления допустимых пределов ишемии и критериев приемлемого качества HSPC. Например, в отношении переменной результата %CD34+ для рассмотрения конкретной донорской кости могут потребоваться прогнозируемые значения, составляющие более 80%.

Описанные выше модели и примеры, представленные в таблицах на **фиг. 12а–14С**, предполагают, что приемлемые уровни качества HSPC достижимы, несмотря на длительное время ишемии, которое неизбежно, когда кости должны быть получены в географически разбросанных ОРО и отправлены на большие расстояния в центры обработки. Даже в таких условиях можно добиться благоприятного сочетания времени тепловой и холодовой

ишемии, что позволяет достичь %CD34+ жизнеспособности в диапазоне 80–90%. Модели также предполагают, что замораживание тела перед извлечением костной ткани, что является обычной практикой при извлечении тканей, менее целесообразно в контексте извлечения костного мозга. Например, при использовании охлаждения всего тела жизнеспособность CD34+ составила в среднем 72,75%, в то время как при *отсутствии* охлаждения тела среднее значение было чуть ниже 90%. Эти модели предполагают, что оптимальной практикой будет отказ от охлаждения тела и максимально быстрое перемещение извлекаемой кости в условия холодовой ишемии. Модели также показывают, что ограничение WIT (времени тепловой ишемии) менее чем восемью (8) часами и CIT (времени холодовой ишемии) менее чем 40 часами оптимизирует возможность извлечения значимого количества жизнеспособных клеток из донорской кости.

Раскрытые в настоящем документе модели прогнозируют жизнеспособность в соответствии с графиком, показанным на **фиг. 15**, где порог жизнеспособности CD34+ клеток, составляющий 80%, определен как приемлемый. Как отражено на графике, зависимость между временем тепловой и холодовой ишемии следует кривой от точки, в которой WIT составляет 10 часов, а CIT – 18 часов, до точки, в которой WIT составляет 1 час, а CIT – 27 часов.

Более подробную информацию о способе прогнозирования жизнеспособности клеток согласно настоящему изобретению можно найти в Приложении В к настоящей заявке, все раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Настоящее раскрытие следует рассматривать как иллюстративное и неограничивающее по своему характеру. Подразумевается, что представлены только некоторые варианты осуществления, и что все изменения, модификации и дополнительные применения, которые соответствуют сути настоящего изобретения, находятся в пределах объема правовой охраны.

ПРИЛОЖЕНИЕ А**ОБНАРУЖЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КРУПНОГО ИСТОЧНИКА ПЕРВИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ПЛОТНО ПРИКРЕПЛЕННЫХ К КОСТНЫМ ПОВЕРХНОСТЯМ ПОЗВОНКА, ФОРМИРУЮЩИМ КОСТНОМОЗГОВЫЕ ПОЛОСТИ**

Брайан Х. Джонстон^{1,2}, Ханна М. Миллер^{1,2}, Донгшенг Гу¹, Сридхар Тирумала³, Мадлен Р. Бек³, Майкл ЛаФонтен², Джеральд Брандахер⁴, Эрик Дж. Вудс^{1,2,3*}

¹Оссиум Хелс Инк., 5754 З. ул. 74, Индианаполис, Индиана 46278

²Кафедра биомедицинских наук, Колледж остеопатической медицины, Мэрианский университет, Индианаполис, Индиана, США

³Кафедра медицинской и молекулярной генетики, Медицинский факультет Университета Индианы, Индианаполис, Индиана, США

⁴Кафедра пластической и реконструктивной хирургии, Медицинский факультет Университета Джона Хопкинса, Балтимор, Мэриленд, США

*Адрес для корреспонденции: Эрик Дж. Вудс, Оссиум Хелс Инк., 5754 W. ул. 74, Индианаполис, Индиана 46278

Email: Enk@OssiumHealth.com

РЕФЕРАТ

Мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК), используемые для аллогенной терапии, в настоящее время проходят клинические испытания для оценки их эффективности при лечении многих различных заболеваний. В случае возможной коммерциализации для широкого распространения этого подхода потребуется дальнейшее совершенствование производственных процессов для экономически выгодного производства МСК в достаточных количествах, необходимых для удовлетворения прогнозируемого спроса. Ключевым фактором, определяющим высокую себестоимость производства МСК в настоящее время, является необходимость создания главных банков клеток (ГБК), полученных от разных доноров, что приводит к нестабильности показателей при крупномасштабном производстве. Следовательно, обнаружение крупных депо первичных МСК у отдельно взятого донора стало бы стимулом для развития рынка клеточной терапии благодаря снижению затрат, связанных с производством.

Мы установили, что с костным матриксом тела позвонка (ТП) тесно связана многочисленная популяция клеток, которые обладают всеми признаками МСК и высвобождаются только после протеолитической обработки. В данной работе мы показали, что эти прикрепленные к костной ткани позвонка (пКП) клетки обладают всеми

характеристиками МСК, установленными Международным обществом клеточной и генной терапии (ISCT) (т.к. адгезия к пластику, экспрессия поверхностных маркеров и трехлинейная дифференцировка) и поэтому назвали их пКП-МСК, чтобы отличить эту популяцию клеток от слабосвязанных МСК, которые могут быть получены путем аспирации или промывки костных полостей, содержащих костный мозг.

Было проведено пилотное исследование по созданию банков и размножению пКП-МСК, полученных от 3 умерших доноров, и показано, что банк клеток, полученный после первого пассажа из 100 г обработанных костных фрагментов ТП, в среднем содержит $2,9 \times 10^8 \pm 1,35 \times 10^8$ пКП-МСК. Было установлено, что клетки из всех банков способны к пролиферации в течение 9 пассажей без существенного снижения времени удвоения популяции. Расчетный средний суммарный выход при ограниченном размножении в течение 4 пассажей составит 2 триллиона (2×10^{12}) клеток от одного донора, что соответствует 30 000 доз по 10^6 клеток/кг для среднего пациента весом 70 кг. Таким образом, нами обнаружен новый обильный источник МСК, который будет способствовать развитию рынка препаратов для клеточной терапии благодаря устранению неэффективности производства и несоответствия нормативным требованиям, обусловленным различиями между донорами.

Ключевые слова

Мезенхимальные стромальные/стволовые клетки МСК человека, Тело позвонка, Костный мозг, Клеточная терапия, Регенеративная медицина, Крупномасштабное производство

Сокращения

ВВЕДЕНИЕ

Высокая активность, а также хорошая способность к размножению мезенхимальных стромальных/стволовых клеток (МСК) привлекают значительный интерес со стороны коммерческих организаций к разработке готовых к использованию терапевтических средств на основе аллогенных МСК, полученных от ограниченного числа доноров. Разработка клеточной терапии на основе аллогенных «универсальных доноров» предоставит возможность создания контролируемого производства, предполагающего наличие тщательной оценки качества (например, идентичности, активности, чистоты и безопасности) каждой произведенной партии при значительной экономии затрат по сравнению с производством отдельных партий аутологичных клеток, полученных от индивидуальных доноров, как это в настоящее время происходит при производстве

терапевтических средств на основе Т-лимфоцитов с химерными рецепторами антигена (ХРА).

Проблемы, присущие производству препаратов для клеточной терапии, изменяются в соответствии с масштабами производственного цикла. Эффективные дозы МСК по некоторым данным достигают 1×10^9 клеток на дозу, что обуславливает потребность производства 10 триллионов (10×10^{12}) клеток в год для удовлетворения потенциального спроса [1-4]. Даже при таком уровне производства, с предполагаемой экономией на его масштабности, себестоимость одной дозы МСК может превышать 100 тыс. долларов [3]. Существенным фактором, определяющим производственные затраты, значение которого увеличивается пропорционально размеру партии, является необходимость пополнения главных банков клеток (ГБК) путем получения МСК от новых доноров вследствие ограниченных объемов тканей и жидкостей, которые можно безопасно получать от здоровых добровольцев, и ограниченный потенциал размножения МСК, выделенных от отдельного донора [5, 6]. МСК редко встречаются во всех тканях, составляя, например, ~0,001-0,01% от общего количества содержащих ядро клеток в аспиратах костного мозга (КМ) [7]. Учитывая, что аспираты КМ, полученные от здоровых добровольцев, для безопасности донора не могут превышать 100 мл (50 мл с обеих сторон от гребней подвздошной кости), общий выход свежих, не подвергавшихся культивированию МСК составляет примерно 2×10^4 от одного донора. Для получения триллиона клеток потребуется посевной материал, содержащий 1×10^7 МСК, чтобы ограничить пролиферацию клеток 9 циклами удвоения популяции [8]. Это количество не учитывает клеток, оставляемых в резерве для контроля качества размноженных ГБК и рабочего банка клеток (РБК). Таким образом, количество МСК, получаемых от одного донора, более чем на три порядка меньше оптимального для начальных этапов экспансии.

Необходимость постоянного пополнения банков клеток за счет свежих клеток от новых доноров вносит нестабильность в производственный процесс из-за наблюдаемых отличий в характеристиках МСК, полученных от разных доноров, даже если они имеют одинаковый возраст и состояние здоровья [6, 9, 10]. Изменчивость характеристик клеток от донора к донору достаточно велика, как и ее влияние на производственные затраты. В одном исследовании, где изучали крупномасштабное производство нескольких партий МСК, полученных от разных доноров, было установлено, что суммарное число удвоения популяции в течение 30 дней культивирования отличалось в 1,8 раз для клеток, полученных от 5 разных доноров КМ [9]. Из-за этого время, необходимое для производства партии МСК численностью 350 млн клеток, варьировало в пределах 13 дней. Помимо логистических проблем, связанных с координацией процессов производства отдельных партий клеток,

соразмерно возросла стоимость питательной среды, которая также является ключевым фактором, определяющим издержки производства препаратов клеточной терапии [1, 3, 8]. Кроме того, авторы обнаружили существование различий в способности к образованию колоний и в экспрессии интерлейкина 6, которые превышают 18% и 50%, соответственно, что дополнительно усложняет контроль качества и активности клеток из партий, полученных от отдельных доноров. Аналогичным образом, в одном из центров в ходе клинического производства 68 партий МСК из КМ, полученного от 59 доноров-добровольцев, было обнаружено, что время удвоения популяции отличалось более, чем в 2 раза (46,8 – 141 час), составляя в среднем 71,7 часа, из-за чего конечное количество МСК в партии варьировало от $1,9 \times 10^7$ до $5,43 \times 10^9$ (в среднем $5,46 \times 10^8$) [10].

Помимо прямого экономического бремени, связанного с увеличением себестоимости одного производственного цикла, существует также нормативное бремя с соответствующими затратами, связанными с необходимостью обновления банков клеток. ГБК служит резервом исходного материала для всех производственных циклов, в которых используются клетки от конкретного донора. Выполнение нормативных требований к оценке качества и безопасности ГБК требует значительных затрат средств и времени [11]. Из трех ключевых параметров (т. к. безопасность, эффективность и идентичность), необходимых для оценки пригодности произведенного препарата клеточной терапии, эффективность, поскольку она связана с индивидуальными характеристиками донора, является наиболее проблематичной из-за изменений фенотипа, происходящих при размножении клеток, описанного выше. Это в особенности касается популяций МСК, приближающихся к пределу размножения и вступающих в стадию старения, что сильно ограничивает их активность [12]. Поэтому ограничение числа удвоения популяции является важным фактором для регулирующих органов; хотя этот показатель обычно не упоминается в документах Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA) США [13].

Для снижения экономического и нормативного бремени, связанного с созданием большого количества ГБК ежегодно для удовлетворения потребности в крупномасштабном производстве, требуется найти крупные депо нативных МСК. Возможным решением этой задачи могут стать ткани, содержащие значительные количества МСК, которые обычно утилизируют после рутинных медицинских процедур или которые могут быть получены посмертно. В последнее время предметом детальных исследований были стволовые/стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ), которые получают в ходе плановых операций, обычно дающих литры ткани. Однако они предназначены в первую очередь для аутологичного использования [14, 15]. Выделение непосредственно из костей,

содержащих костномозговую полость, которые были получены в результате медицинских операций или из трупного материала, дает более высокий процент МСК (~0,04%) по сравнению с аспиратами, что, вероятнее всего, отражает отсутствие контаминации периферической кровью [16]. В целом, до $\sim 5 \times 10^9$ содержащих ядро клеток удалось получить из костного мозга тел позвонков (ТП), полученных от посмертных доноров органов, при этом каждое ТП содержало $\sim 2 \times 10^6$ МСК, а типичный извлеченный сегмент позвоночника из девяти позвонков – до $\sim 2 \times 10^7$ МСК [17]. Кроме того, источниками костного мозга, пригодными для извлечения МСК, являются подвздошные кости, грудина, ребра и головки длинных костей [18-20]. Таким образом, только один содержащий КМ участок тела позвонка от типичного посмертного донора дает МСК на >3 порядка больше, чем можно получить от здорового донора.

Наряду с клетками, полученными путем элюирования или аспирации КМ, другая популяция МСК тесно связана с костными структурами медуллярной полости [21-23]. Прикрепленные к кости МСК (ПК-МСК) впервые были обнаружены в длинных костях грызунов, а впоследствии были выделены из фрагментов кости человека, полученных из суставных головок длинных костей и позвонков [24]. Мы обнаружили еще один источник МСК, названных прикрепленными к костной ткани позвонка МСК (пКП-МСК), которые остаются прикрепленными к фрагментам кости ТП после тщательной промывки для удаления клеток КМ и могут быть высвобождены только после обработки протеазами. По своим относительному содержанию и функциональным характеристикам пКП-МСК эквивалентны элюированным МСК костного мозга ТП. Здесь мы представляем полученные данные и показываем существование нового источника МСК, который может быть использован в крупномасштабных производственных процессах для производства партий общим количеством более квадриллиона клеток от отдельного донора; что позволяет удовлетворить самые оптимистичные уровни спроса на десятилетия и преодолеть сложившиеся препятствия для производства в промышленных масштабах [2, 8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источники тканей и клеток

Забор позвонков осуществлялся у доноров органов с мертвым головным мозгом после их сердечной смерти и получения информированного согласия на использование материала в исследовательских целях от живых членов семьи. Каждому полученному позвонку присваивали уникальный идентификатор. Критериями включения для отбора донора были смерть головного мозга, возраст 12-55 лет, отсутствие сепсиса, а также отсутствие болезней и патогенов. Полученный путем аспирации донорский КМ от трех здоровых добровольцев был приобретен в Lonza (Walkersville, MD). Размноженные живые

донорские МСК, подвергнутые криоконсервации на 2 пассаже, были приобретены у Lonza. Характеристики доноров представлены в табл. 1.

Забор и транспортировка тканей посмертного донора

В качестве основы протоколов забора и транспортировки органов и тканей были использованы ранее разработанные клинические методы [16, 25] в сочетании с последующим опытом продолжающегося клинического исследования иммунной толерантности к васкуляризованному композитному аллотрансплантату (VCA) (идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT01459107) в Университете Джона Хопкинса. Применялась оптимизированная процедура забора органов, предоставленная организацией по закупке органов (ОЗО) в сочетании со специальными наборами и централизованным обучением процедурам забора и транспортировки. Полученные кости транспортировали в Оссиум Хелс (Индианаполис, Индиана). Участки позвоночника были закуплены шестью разными партнерами ОЗО: Дар надежды (Айтаска, Иллинойс); Донорский альянс (Денвер, Колорадо); Сеть доноров Айовы (Северная Либерти, Айова); Мид Америка Трансплант (Сент-Луис, Миссури); и Донорская сеть Невады (Лас-Вегас, Невада). Забор костей от доноров органов и тканей, для которых было предоставлено согласие на проведение исследований, проводил персонал ОЗО с помощью остеотома и молотка в соответствии с протоколом, одобренным Экспертным советом организации. Извлеченные кости обертывали хирургическими полотенцами с марлевыми тампонами, смоченными физиологическим раствором, чтобы обеспечить удержание влаги во время транспортировки. Упакованные образцы транспортировали в течение ночи на льду в один из двух пунктов переработки.

Ручная очистка

После получения образцов мягкие ткани удаляли вручную с помощью скальпелей и долота в шкафу биологической безопасности. Ножки дуги позвонка, после того как они стали видимыми, удаляли с помощью ленточной пилы для обработки тканей или пилы Stryker System 6 (Stryker, Kalamazoo, MI), оставляя только соединенные тела позвонков. Тела позвонков отделяли друг от друга и удаляли скальпелем межпозвоночный диск и мягкие ткани. На протяжении всего процесса очистки следили за тем, чтобы не повредить кортикальный слой кости, который сохраняет и защищает гипоксическую губчатую костную ткань, содержащую костный мозг.

С помощью изготовленных на заказ хирургических ножниц из нержавеющей стали разрезали ТП на кусочки размером примерно 5 см³, достаточно мелкие, чтобы их можно было фрагментировать с помощью измельчителя костей. Кусочки позвонков немедленно погружали в 500 мл среды для обработки, состоящей из Plasma-Lyte A pH 7,4 (Baxter

Healthcare, Дирфилд, Иллинойс), содержащей 2,5% сывороточного альбумина человека (ЧСА; Octapharma USA Inc., Хобокен, Нью Джерси), 3 ед/мл бензонуклеазы (EMD Millipore, Берлингтон, Массачусетс) и 10 ед/мл гепарина (McKesson, Ирвинг, Техас).

Измельчение и элюирование

Измельчитель костей (Bioger Technologies, Inc., Майами, Флорида) был установлен в шкафу биологической безопасности. Двухлитровый стакан из нержавеющей стали, содержащий около 250 мл свежей среды для обработки, помещали под головку измельчителя так, чтобы под нее попадала костная стружка и среда. Для проталкивания фрагментов кости через измельчитель использовали поршень из нержавеющей стали. Для предотвращения высыхания и прилипания фрагментов кости к камере измельчителя ее промывали средой для обработки. После измельчения всех фрагментов кости камеру тщательно промывали свежей средой для обработки. Конечный объем среды в стакане из нержавеющей стали составлял один литр.

Фильтрацию проводили с использованием наборов для сбора костного мозга с гибким предварительным фильтром и встроенными фильтрами (Fresenius Kabi, Lake Zurich, IL). Всю измельченную костную ткань и среду аккуратно переносили в устройство для сбора костного мозга. Измельченную массу осторожно помешивали, чтобы обеспечить максимальное высвобождение клеток. Затем среду фильтровали с использованием двух фильтров с размером пор 500 мкм и двух фильтров с размером пор 200 мкм.

Измельченные кости дважды промывали средой для промывки объемом 500 мл. В качестве среды для промывки использовали Plasma-lyte с 2,5% ЧСА. Затем весь костный мозг собирали в сборный пакет, откуда отбирали образцы для экспериментов.

Протокол обработки для выделения МСК

Измельченную костную ткань (1 или 100 г) переносили в конические центрифужные пробирки на 50 мл или в пакеты WhirlPak на 250 мл. К измельченной костной ткани добавляли раствор коллагеназы DE10 (2 мг/мл; Vitacyte, Indianapolis, IN) в соотношении 5:1 (объем:масса). Пробирки или пакеты переносили во встряхивающий инкубатор и инкубировали в течение 2 часов при 37 °С при встряхивании со скоростью 125 об/мин. Протеазу инактивировали добавлением 2% Stemulate (Cook Regentec, Indianapolis, IN), после чего суспензию фильтровали через крышку-фильтр с размером пор 70 мкм в 50 мл конические пробирки с завинчивающейся крышкой. Оставшиеся на фильтре фрагменты костной ткани промывали 25 мл модифицированного фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS), содержащего 10 ед/мл гепарина и 100 ед/мл бензонуклеазы, полученный смыв объединяли с исходным фильтратом. Пробирки центрифугировали при 350× g в течение 5 минут, супернатант удаляли аспирацией, а осадок ресуспендировали в

10 мл DPBS. Суспензию повторно центрифугировали при $350\times g$ в течение 5 минут, супернатант удаляли аспирацией, а осадок ресуспендировали в DPBS для анализа.

Выделение МСК из костного мозга подвздошной кости и тела позвонка

Аликвоту концентрированного элюированного КМ объемом 1 мл переносили в коническую пробирку объемом 50 мл и ресуспендировали в 49 мл DPBS. Пробирку центрифугировали при $300\times g$ в течение 10 минут, супернатант удаляли аспирацией, а осадок ресуспендировали в 10 мл питательной среды Rooster-Nourish (Rooster Bio, Frederick, MD). Подсчет клеток и дальнейшее культивирование проводили как описано ниже.

Подсчет клеток

Для определения общего количества жизнеспособных клеток использовали счетчик клеток Cellometer Vision (Nexcelom, Лоуренс, Массачусетс). 20 мкл реагента ViaStain AOPI (Nexcelom) добавляли в пластиковую пробирку, содержащую 20 мкл клеток. После перемешивания 20 мкл раствора наносили на предметное стекло счетчика клеток и подсчитывали общее количество клеток, количество живых клеток и жизнеспособность.

Клеточная культура

Свежие клетки высевали во флаконы CellBIND® T-225 при плотности $2,5\times 10^3$ жизнеспособных клеток/см² в среде Rooster-Nourish (Rooster Bio, Фредерик, Мэриленд). Неприкрепившиеся клетки удаляли при первой смене среды в первые сутки. После этого среду меняли каждые 3-4 суток до достижения клетками 80-90% конфлюэнтного монослоя. Клетки снимали с помощью TrypLE (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Культивируемые клетки высевали при плотности $3,0\times 10^3$ клеток/см², в остальном использовали тот же протокол, что и для свежих клеток.

Для создания ГБК от трех доноров (DD5, DD6 и DD7) использовали флаконы CellBind® Hyperflasks. Свежие первичные гидролизаты первоначально высевали при плотности $2,5\times 10^3$ жизнеспособных клеток/см², как указано выше. Клетки снимали с помощью TrypLE и размножали один дополнительный пассаж, чтобы сформировать ГБК. Основную массу клеток после первого пассажа ресуспендировали в среде для криоконсервации (CryoStor CS10; BioLife Solutions, Ботелл, Вашингтон) и хранили в паровой фазе жидкого азота.

Клетки пассировали до десяти раз в среде DMEM (Cat# 10567014, ThermoFisher, США), содержащей 248 мкМ аскорбиновой кислоты (Cat# A2218, Sigma, США), 10 нг/мл рекомбинантного основного фактора роста фибробластов (Cat# 233-GMP-025, R&D Systems, США) и 10 нг/мл рекомбинантного эпидермального фактора роста (Cat#236-GMP-200, R&D Systems, США). После достижения 70-80% конфлюэнтного монослоя клетки

собирали и подсчитывали их общее количество. Часть клеток повторно высевали при плотности $3,0 \times 10^3$ клеток/см² в трех повторностях в 6-луночный планшет со сменой среды каждые 3-4 суток.

Фенотипический анализ МСК методом проточной цитометрии

На 2, 3 и 4 пассажах, в разные лунки 96-луночного планшета с V-образным дном, вносили по 1,8 мкл моноклональных антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой, или красителя: CD3, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, HLA-DR, CD73, CD90, CD105, Stro-1 и 7-AAD (см. дополнительную табл. S1). В каждую лунку, содержащую антитела, добавляли 100 мкл буфера MACS (Miltenyi BioTec) и 100 мкл клеток ($2,0 \times 10^5$ клеток). Планшет инкубировали при 4 °C 30 минут в защищенном от света месте, после чего центрифугировали 5 минут при $300 \times g$. Клетки промывали и ресуспендировали в 200 мкл буфера MACS. Для сбора данных использовали проточный цитометр ACEA Biosciences NovoCyte 2060R, полученные данные анализировали с помощью ПО NovoExpress (Acea Biosciences, Сан Диего, Калифорния).

Трехлинейная дифференцировка МСК

После первого пассажа МСК высевали в лунки 12-луночного планшета, содержащие по 3 мл Mesencult (Stem Cell Technologies, Ванкувер, Британская Колумбия), при плотности $8,0 \times 10^4$; $4,0 \times 10^4$ или $2,0 \times 10^4$ для индукции дифференцировки по пути хондрогенеза, адипогенеза или остеогенеза. В качестве контроля также высевали лунку, содержащую $4,0 \times 10^4$ МСК. После инкубации в течение 2 часов в лунке для индукции хондрогенеза среду Mesencult заменяли средой для хондрогенеза StemPro (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). В лунках для индукции адипогенеза и остеогенеза, среду Mesencult через один день отбирали аспирацией и заменяли средой для адипогенеза StemPro или средой для остеогенеза StemPro, соответственно. Замену соответствующих сред для индукции дифференцировки, а также Mesencult в контрольных лунках проводили каждые 3 суток. Через 14, 12 и 16 суток из лунок, содержащих хондроциты, адипоциты и остеоциты, соответственно, удаляли аспирацией среду, дважды промывали клетки DPBS, фиксировали 4% формалином в течение 30 минут, один раз промывали DPBS и окрашивали. Альциановый синий, который окрашивает протеогликаны хондроцитов в синий цвет, добавляли в виде раствора в 0,1 н. HCl в лунку для дифференцировки хондроцитов на 30 минут, краситель удаляли аспирацией, лунку трижды промывали 0,1 н. HCl и нейтрализовали дистиллированной водой, после чего хондроциты исследовали под инвертированным световым микроскопом (Nikon). Масляный красный O, который окрашивает жировые глобулы адипоцитов в красный цвет, добавляли в лунку для дифференцировки адипоцитов на 15 минут, затем краситель удаляли аспирацией, лунку

трижды промывали дистиллированной водой, после чего адипоциты исследовали под инвертированным световым микроскопом. 2% раствор ализаринового красного, который окрашивает отложения кальция в остеоцитах в красный цвет, добавляли в лунку для дифференцировки остеоцитов на 3 минуты, затем краситель удаляли аспирацией, лунку трижды промывали дистиллированной водой, после чего остеоциты исследовали под инвертированным световым микроскопом. Все дифференцированные клетки подвергали качественному анализу путем исследования специфического окрашивания и фенотипического профиля.

Время удвоения популяции

Время удвоения популяции определяли в каждом пассаже по формуле: $t \cdot \log(2) / \log(T_1/T_0)$, где t – время (часы) между начальным посевом и достижением клетками 90% конфлюэнтного монослоя, T_1 – количество снятых клеток, а T_0 – количество клеток при посеве.

Анализ колониеобразующих единиц фибробластов

Для свежих обработанных клеток в три лунки 6-луночного планшета добавляли по 5 мл Mesencult, 20 мкл амфотерицина В и 100 мкл гентамицина. В первую, вторую и третью лунки добавляли $2,5 \times 10^5$; $5,0 \times 10^5$ и $7,5 \times 10^5$ клеток соответственно. Планшеты помещали в инкубатор до достижения колониями состояния 90% конфлюэнтности или на срок до 12 суток. Замену среды выполняли каждые 3-4 суток в течение 14 суток. После этого планшеты дважды промывали DPBS и в каждую лунку добавляли 2 мл метанола на 5 минут для фиксации клеток. Через 5 минут метанол сливали, планшет подсушивали на воздухе и проводили окрашивание колоний 1% раствором кристаллического фиолетового. Подсчитывали колонии, содержащие >50 клеток. Культивируемые клетки анализировали подобным образом, за исключением того, что клетки высевали при плотности 32 клетки/см², 65 клеток/см² и 125 клеток/см².

Анализ подавления активации Т-клеток

Анализ подавления активации Т-клеток проводили согласно ранее опубликованным протоколам с небольшими изменениями [26]. Вкратце, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из 10 мл цельной крови, разделяя в градиенте фикола (GE, Чикаго, Иллинойс), и ресуспендировали в DPBS. Большую часть клеток окрашивали сукцинимидиловым эфиром диацетата карбоксифлуоресцеина (CFSE; Sigma, Сент-Луис, Миссури) и замораживали до использования [21]. МСК на 2 или 3-м пассаже, которые в некоторых случаях предварительно стимулировали 100 нг/мл интерферона- γ (ИФН- γ ; R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота) в течение 18-24 часов, ресуспендировали в среде RoosterNourish (RoosterBio, Фредерик, Мэриленд) и помещали в 96-луночный

планшет с плоским дном в количестве $4,0 \times 10^5$; $1,0 \times 10^5$; $5,0 \times 10^4$; $2,5 \times 10^4$; $1,5 \times 10^4$; 5×10^3 клеток/лунку. Затем в каждую лунку добавляли среду RoosterNourish до конечного объема 200 мкл/лунку. Планшет помещали в инкубатор с температурой 37 °С, 10% CO₂ и 5% влажностью не менее, чем на два часа, чтобы обеспечить прикрепление МСК. Криоконсервированные МКПК быстро размораживали и ресуспендировали при концентрации $4,0 \times 10^6$ клеток/мл в минимальной питательной среде Игла (EMEM; Stem Cell Technologies) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС), 100 мкг/мл раствора пенициллина и стрептомицина PenStrep, 2 мМ L-глутамин и 100 мкМ β-меркаптоэтанола. Из планшетов, содержащих МСК, удаляли аспирацией среду и во все лунки вносили по 100 мкл МКПК. Т-клетки стимулировали добавлением 100 мкл дополненной среды EMEM с 40 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) в каждую лунку, содержащую МСК и МКПК. Контрольные лунки содержали только меченые и немеченые МКПК, половина из которых подвергалась стимуляции ФГА, а половина – нет. Планшет возвращали в инкубатор. Через 4 суток из каждой лунки отбирали МКПК и метили с использованием 5 мкл CD3-PE и 5 мкл 7AAD для последующей проточной цитометрии.

Методы статистического анализа

Для статистического анализа (t-критерий Стьюдента) использовали GraphPad Prism 8 версии. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Типичный участок позвоночника (обычно T8-L5) до и после удаления мягких тканей, разделения ТП и последующего фрагментирования до размеров примерно $1,5 \text{ см}^3$ показан на рис. 1. Прикрепляющиеся к пластику пКП-МСК в культуре имели типичную веретеновидную морфологию (рис. 1, Г).

Клетки, полученные от доноров, размножали в течение 4 пассажей (первый посев считался нулевым пассажем) и анализировали методом проточной цитометрии. пКП-МСК в 1-4-м пассажах характеризовались незначительными уровнями экспрессии поверхностных маркеров CD14, CD19, CD34 и CD45, специфических для гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, и низким уровнем или отсутствием лейкоцитарного антигена человека DR (HLA-DR) (рис. 2А). Количество клеток, экспрессирующих PECAM1 (CD31) (обычно эндотелиальные клетки и моноциты), во 2-м пассаже также были небольшим (<7%) (данные не показаны). Напротив, культивируемые пКП-МСК были однородно положительными по экспрессии маркеров CD73, CD90 и CD105. Таким образом, пКП-МСК обладают характерным профилем экспрессии поверхностных маркеров МСК [28]. Кроме того, у некоторой части клеток (примерно 20%

или меньше, в зависимости от числа пассажиров) был также обнаружен поверхностный маркер Stro-1, характерный для мультипотентных МСК [29-32].

Способность пКП-МСК к хондрогенной, адипогенной и остеогенной дифференцировке определяли в 3-м пассаже отдельно для каждого донора. пКП-МСК, полученные от всех доноров, оказались способны дифференцироваться в хондроциты, адипоциты и остециты (рис. 2Б). Часть свежевыделенных (т. е. никогда не пассированных) и культивированных пКП-МСК характеризовалась высокой степенью клональной пролиферации, о чем свидетельствовала активность колониеобразующих единиц-фибробластов (КОЕф). Среднее содержание КОЕф в костных фрагментах VB после протеазной обработки составляло $0,01 \pm 0,004\%$ (среднее \pm стандартное отклонение), что соответствует содержанию пролиферативно активных МСК в костном мозге в целом (рис. 3) [7]. Проллиферативно активные клетки сохранялись при культивировании, частота образования колоний составила $37 \pm 3,4\%$ и $27 \pm 1,2\%$ после одного и двух пассажей, соответственно.

Подавление активации Т-лимфоцитов является одним из наиболее изученных терапевтических свойств МСК, что дает основание для их использования в клинических испытаниях терапии воспалительных заболеваний [33, 34]. пКП-МСК, полученные от трех разных доноров, дозозависимо подавляли активацию Т-клеток, индуцированную с помощью ФГА (рис. 4). Максимальное подавление при соотношении пКП-МСК и мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) 1:1 составляло $89 \pm 7\%$. Небольшое, но незначительное увеличение подавления при всех соотношениях наблюдалось после предварительной обработки пКП-МСК ИФН- γ в течение 18-24 часов перед проведением анализа. Было показано, что обработка ИФН- γ стимулирует супрессивные функции МСК с усиленным действием в отношении стареющих клеток [12]. Отсутствие усиления ответа при обработке ИФН- γ свидетельствует о том, что культивируемые пКП-МСК сохраняют полную иммуномодулирующую способность.

Имунофенотипический профиль прикрепляющихся к пластику пКП-МСК, способность к трехлинейной дифференцировке и активность КОЕф, а также иммуномодулирующие свойства подтверждают классификацию этих клеток как МСК в соответствии с опубликованным руководством Международного общества клеточной и генной терапии (ISCT) [28]. Для дальнейшего подтверждения их эквивалентности МСК, полученным из КМ, было проведено сравнение пКП-МСК и МСК, выделенных из центрального КМ (рис. 5 и 6). Для этого использовали коммерчески доступные предварительно размноженные КМ-МСК от живых доноров (Размн. LD КМ-МСК), криоконсервированные после 2-го пассажа, и МСК, свежевыделенные из КМ, полученного

аспирацией от живых доноров (LD КМ-МСК). Кроме того, в сравнение были включены МСК, выделенные из костного мозга тела позвонков посмертного донора (DD пКМ-МСК). МСК, полученные от трех доноров, из каждого источника размножили до 2-го пассажа и подвергли криоконсервации. После разморозки клетки перед проведением анализов один раз пассировали. Было установлено, что МСК из всех четырех источников имеют по сути идентичные иммунофенотипические профили поверхностных клеточных маркеров с очень небольшим количеством клеток, экспрессировавших CD14, CD19, CD34, CD45 и HLA-DR, и, наоборот, почти все клетки экспрессировали CD73, CD90 и CD105 (рис. 5А).

МСК из каждого источника характеризовались быстрым ростом в культуре в течение 5 пассажей (самый длительный исследованный период) и не отличались по времени удвоения популяции на 4-м и 5-м пассажах (рис. 5В и Г). Размн. LD КМ-МСК, которые были получены предварительно размноженными до 2-го пассажа, имели значительно более высокое время удвоения популяции в 3-м пассаже по сравнению с другими популяциями МСК (рис. 5Б).

Потенциал КОЕф Размн. LD КМ-МСК на 2-м пассаже также был значительно ниже, чем у других популяций МСК (рис. 5Д). На более поздних пассажах сравнения потенциала КОЕф для разных типов МСК не проводили. При сравнении способности к трехлинейной дифференцировке было обнаружено, что все популяции МСК образовывали адипоциты, хондроциты и остециты *in vitro* примерно с равной частотой (рис. 6).

Пригодность пКП-МСК для использования в клинической практике оценили в ходе пилотного производственного цикла, в ходе которого изучали возможности создания банка и размножения клеток от индивидуальных доноров в большом количестве. Для выделения пКП-МСК использовали фрагменты ТП, полученные от трех разных доноров. Взятое количество (100 г) соответствовало примерно одной трети общего веса костного фрагмента ТП, который может быть получен от типичного донора. После первого пассажа из материала, полученного от каждого донора, был приготовлен ГБК, содержащий в среднем $2,9 \times 10^8 \pm 1,35 \times 10^8$ пКП-МСК. Основную массу клеток подвергли криоконсервированию, а оставшуюся часть культивировали в течение нескольких пассажей, отслеживая общий выход клеток в каждом пассаже (рис. 7А). Оптимальными для создания ГБК считали клетки после первого пассажа, которые практически не отличались профилем поверхностных маркеров и потенциалом КОЕф от клеток на более поздних пассажах (рис. 2 и 3). Однократной дополнительной экспансии клеток до 2-го пассажа было достаточно для получения РБК, содержащего $5,17 \times 10^9 \pm 4,3 \times 10^9$ пКП-МСК. Исходя из полученных значений времени удвоения популяции, для производства более триллиона клеток будет достаточно двух экспансий всего РБК. Время удвоения популяции почти не изменялось

между 2-м и 9-м пассажами без признаков уменьшения скорости роста в более поздних пассажах. Тем не менее, были обнаружены различия между временем удвоения популяции МСК, полученных от разных доноров (рис. 7Б). На основании значений времени удвоения популяции, полученных для разных доноров, можно рассчитать, что для производства одного триллиона клеток из исходного материала количеством 2 млн пКП-МСК потребуется 23, 36 и 29 дней. Эти показатели рассчитаны для выращивания клеток в двумерных культуральных флаконах и, вероятно, будут иными при использовании биореакторов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Преобразующий потенциал МСК для лечения широкого спектра заболеваний идеализировался более десятилетия; тем не менее, несмотря на многочисленные примеры применения этого потенциала в доклинических и на ранних стадиях клинических испытаний, ни один из методов терапии с использованием МСК не достиг успеха в поздних, регистрационных (обычно фаза III в США) клинических испытаниях, хотя некоторые из них получили разрешение для использования в ограниченных случаях на относительно небольших территориях. Причины медленного прогресса в выдаче разрешений на использование и, как следствие, коммерциализации терапевтических средств на основе МСК, несмотря на интенсивные усилия по их разработке, предпринимаемые многочисленными организациями, безусловно, многофакторны. Обращаясь к прошлому, кажется, что одним из таких факторов могли быть попытки производства МСК в больших масштабах за счет внедрения процессов и процедур из очень успешного биофармацевтического сектора [35, 36]. Существует множество различий между производством продуктов, полученных из клеток, и самих клеток. Биофармацевтические препараты производятся с использованием иммортализованных клеточных линий, обладающих способностью к практически неограниченному размножению, что позволяет создавать большие ГБК из ограниченного исходного материала. И наоборот, ограниченные доступность и возможности размножения МСК обуславливают необходимость создания большого количества ГБК из материала, полученного от разных доноров, ежегодно с непропорционально более высокими производственными затратами и нормативным бременем [36].

Мы представляем здесь результаты работы по обнаружению и изучению характеристик крупного источника МСК из костей позвоночника посмертных доноров, которые предлагают эффективное решение для уменьшения этих затрат. Представленные данные показывают, что пКП-МСК по своим фенотипическим и функциональным качествам эквивалентны МСК, полученным из центрального КМ. Эти клетки несут

типичные маркеры МСК (CD73, CD90 и CD105) и не имеют маркеров гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, кроме того, белки HLA II класса у них обнаружены в очень небольших количествах (рис. 2 и 5А). Подобно КМ-МСК, пКП-МСК обладают способностью к клональному размножению и к индукции трехлинейной дифференцировки (рис. 2, 3, 5 и 6). Культивируемые пКП-МСК полностью пригодны для подавления активации Т-клеток, не обнаруживая различий в активности в случае предварительной стимуляции ИФН- γ (рис. 4).

Отличия времени удвоения популяции и КОЕф КМ-МСК, полученных из коммерческого источника, в 3-м пассаже (но не в более поздних пассажах), вероятнее всего, связаны с более медленным восстановлением клеток после криоконсервации во 2-м пассаже (рис. 5В). Для сохранения сопоставимости данных, все МСК выращивали до 2-го пассажа и подвергали криоконсервации, но размноженные КМ-МСК из коммерческого источника могли выращивать в другой среде и замораживать в другой среде для криоконсервации. Таким образом, у этих клеток после оттаивания и культивирования до 3-го пассажа имела место задержка восстановления, которая не проявлялась в последующих пассажах.

Банки клеток размером в среднем $2,4 \times 10^8$ МСК были получены из 100 г подвергнутых протеазной обработке костных фрагментов ТП от каждого из трех доноров (рис. 7А). Каждый банк размножали в течение 9 пассажей без существенного снижения времени удвоения популяции (рис. 7Б). Теоретический выход при размножении всего материала от каждого донора через 9 пассажей мог бы составить $4,0 \times 10^{19}$ (40 квинтиллионов) клеток, что соответствует более чем 500 миллиардам доз по 10^6 клеток/кг для среднего пациента весом 70 кг. Неизбежно, фактический общий выход клеток будет меньше из-за неэффективности, присущей крупномасштабному производству, и требований к испытаниям. Тем не менее, себестоимость производства больших партий МСК от одного донора, вероятно, будет намного меньше, чем производства в эквивалентных масштабах МСК от большого числа доноров. Помимо экономии прямых производственных затрат это приведет к уменьшению нормативного бремени за счет использования единого донорского источника для всех производственных процессов. Следующим шагом в проверке возможного снижения затрат благодаря использованию пКП-МСК будет проведение масштабированных производственных циклов, которые мы и осуществляем в настоящее время.

В настоящий момент мы изучаем вопрос, почему некоторые популяции МСК легко отделяются или, возможно, находятся в неприкрепленном состоянии в КМ, тогда как другие остаются плотно прикрепленными к костному матриксу или соединительной ткани и могут быть высвобождены только после ферментативной обработки. Обнаружение

различий, если они существуют, осложняется относительно низкой частотой встречаемости этих клеток, что затрудняет их исследование обычными аналитическими инструментами, такими как проточная цитометрия, без предварительного размножения в культуре, которое приводит к фенотипическим и функциональным изменениям [37-45]. В одной из предыдущих работ было установлено, что свежие клетки, выделенные из обработанной ферментами губчатой кости таза, содержат в 15 раз больше КОЕф по сравнению с КМ, полученным аспирацией [24]; однако мы не обнаружили подобной разницы между свежевыделенными пКП-МСК и КМ-МСК. Чтобы лучше понять различия между этими популяциями, если таковые имеются, мы в настоящий момент проводим секвенирование РНК (scRNA-Seq) транскриптомов одиночных пКП-МСК [46, 47]. Мы также продолжаем исследовать терапевтический потенциал пКП-МСК путем изучения секрета и внеклеточных везикул, продуцируемых этими клетками.

Таким образом, представленные данные говорят о том, что по своим фундаментальным свойствам пКП-МСК, по-видимому, не отличаются от КМ-МСК, полученных аспирацией; следовательно, эти клетки потенциально могут быть легко заменены при использовании в терапевтических целях со значительным сокращением производственных и нормативных затрат. Кроме того, другие рынки, нуждающиеся в больших количествах МСК, также могут извлечь пользу из обильного источника первичных клеток. Сюда относятся тканевая инженерия и производство продуктов, полученных из МСК, таких как экзосомы, а также прикладные биомедицинские исследования и развивающиеся производства космецевтических препаратов и биоинженерных материалов. Ожидается, что каждый из этих рынков существенно вырастет в следующие десятилетия, стимулируя совокупный спрос на МСК, превышающий 10 секстиллионов ($1,0 \times 10^{21}$) клеток ежегодно к 2040 г. [2]. В будущем высокий спрос на МСК на всех этих рынках может быть полностью удовлетворен за счет пКП-МСК, полученных благодаря более чем достаточному и стабильному предложению костного материала посмертных доноров, содержащего костномозговую полость, от 10 тыс. доноров органов и еще 40 тыс. доноров тканей ежегодно только в США.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Характеристика доноров материала, использованного в этой работе

Идентификатор донора	Тип клеток	Возраст	Пол	Расовая/этническая принадлежность
DD1	пКП-МСК, пКМ-МСК	22	М	Европеоидная раса
DD2	пКП-МСК, пКМ-МСК	13	М	Европеоидная раса
DD3	пКП-МСК	35	М	Латиноамериканцы
DD4	пКП-МСК, пКМ-МСК	19	М	Латиноамериканцы
DD5	пКП-МСК	17	М	Европеоидная раса
DD6	пКП-МСК	14	М	Европеоидная раса
DD7	пКП-МСК	23	М	Европеоидная раса
LD1	LD КМ-МСК	20	Ж	Афроамериканцы
LD2	LD КМ-МСК	23	Ж	Афроамериканцы
LD3	LD КМ-МСК	28	М	Афроамериканцы
LD4	Размн. LD КМ-МСК	24	Ж	Афроамериканцы
LD5	Размн. LD КМ-МСК	36	М	Афроамериканцы
LD6	Размн. LD КМ-МСК	25	М	Афроамериканцы

Сокращения: DD – посмертный донор; LD – живой донор; КМ – костный мозг

Дополнительная таблица S1. Характеристика использованных антител и красителей

Флуоресцентный				
Антитело	краситель	Клон	Изотип	Источник
CD3	PE	UCHL1	IgG1-PE	BD
CD14	PE	MφP9	IgG2b-PE	BD
CD19	PE	4G7	IgG1-PE	BD
CD31	PE	MBC78.2	IgG1-PE	BD
CD34	PE	8G12	IgG1-PE	BD
CD45	APC	F10-89-4	IgG2a-APC	Caprico
HLA-DR	APC	L243	IgG2a-APC	Caprico
CD73	PeCy7	TY/11.8	IgG1-PeCy7	Biolegend
CD90	FITC	F15-42-1	IgG1-FITC	Caprico
CD105	APC	43A3	IgG1-APC	Biolegend
Stro-1	APC	STRO-1	IgM-APC	ThermoFisher
7-AAD ¹	–	–	–	Invitrogen

Сокращения: 7-AAD – 7-аминоактиномицин; PE – фикоэритрин; APC – аллофикоцианин; PeCy7 – фикоэритрин-цианин 7; FITC – флуоресцеин изотиоцианат.

Подписи к рисункам

Рис. 1. Процедура обработки типичного позвоночного столба для выделения ПКП-МСК. Позвонки (обычно T8-L5) очищают от мягких тканей (А) перед отделением тел позвонков (ТП) друг от друга и удалением дисков и оставшихся мягких тканей (Б). ТП измельчают до фрагментов размером примерно $1,5 \text{ см}^3$ (В) перед последующей ферментативной обработкой для высвобождения прикрепленных клеток. (Г) ПКП-МСК, обладающие адгезией к пластику, в культуре имеют типичную веретенообразную форму (клетки во 2-м пассаже).

Рис. 2. Фенотип поверхностных антигенов и трехлинейная дифференцировка ПКП-МСК. (А) Анализ поверхностных антигенов ПКП-МСК от трех разных доноров (DD1, DD2 и DD3; табл. 1) в 1, 2, 3 и 4 пассажах проводили с использованием флуоресцентно меченых антител и проточной цитометрии. Показан процент клеток (гейтировали целые клетки с использованием бокового и прямого рассеяния) после культивирования для каждого пассажа. (Б) ПКП-МСК в 3-м пассаже, выращенные в среде для размножения (Б-А) или индуцированные для прохождения хондрогенеза (Б-Б), адипогенеза (Б-В) или остеогенеза (Б-Г), анализировали с помощью микроскопа после окрашивания на хондроциты (альциановый синий), адипоциты (масляный красный О) или остециты (ализарин красный), как описано в разделе «Материалы и методы». Изображения представляют результаты, полученные для ПКП-МСК от трех различных доноров. Для всех образцов увеличение составляет $20\times$.

Рис. 3. Анализ колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) ПКП-МСК, полученных от трех разных доноров (DD1, DD2 и DD3; табл. 1) и высеянных сразу после выделения из подвергнутого ферментативной обработке материала (свежие) или после 1-го или 2-го пассажей (П1 и П2). $5,0 \times 10^5$ свежих клеток или 624 культивированные клетки от каждого из трех доноров помещали в лунки 6-луночного планшета и инкубировали в течение 14 суток со сменой среды каждые 3-4 суток.

Рис. 4. Подавление активации Т-клеток с помощью ПКП-МСК. (А) Подавление при уменьшении соотношения МКПК и ПКП-МСК. МКПК, выделенные из крови одного донора, метили сукцинимидиловым эфиром диацетата карбоксифлуоресцеина (CSFE). ПКП-МСК инкубировали в течение 2 часов в 96-луночных планшетах для прикрепления клеток перед промывкой и добавлением $4,0 \times 10^5$ МКПК. В некоторых случаях клетки перед добавлением МКПК инкубировали с ИФН- γ (100 нг/мл) в течение 18-24 часов. Т-клетки

стимулировали ФГА в течение 4 суток. Клетки снимали с планшетов и после мечения антителами (anti-CD3-PE) анализировали проточной цитометрией. На графиках приведено относительное количество активированных Т-клеток. **(Б)** Графики, отображающие усредненные данные проточной цитометрии МКПК, неактивированных и активированных ФГА, и активированных ФГА МКПК, которые инкубировали вместе с МСК. Каждая точка представляет среднее значение трех различных экспериментов с клетками, полученными от трех разных доноров (DD1, DD2 и DD3). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение. $P > 0,05$ для всех соотношений МКПК : пКП-МСК +/- ИФН- γ .

Рис. 5. Сравнение пКП-МСК с МСК, выделенными из костного мозга тела позвонка посмертного донора и из КМ, полученного аспирацией из гребня подвздошной кости живых доноров. **(А)** Анализ поверхностных маркеров клеток в 3-м пассаже методом проточной цитометрии. Были использованы МСК, полученные из разных источников: пКП-МСК от посмертного донора (DD пКП-МСК); МСК из костного мозга тела позвонка посмертного донора (DD КМ-МСК); МСК из костного мозга, полученного путем аспирации от живых доноров (LD КМ-МСК); и МСК на 2-м пассаже из коммерческих источников, выделенные из костного мозга, полученного путем аспирации от живых доноров (LD Размн.КМ-МСК). Показано относительное количество клеток в общей популяции после гейтирования дедриса. Отличий в экспрессии поверхностных маркеров между проанализированными типами клеток не обнаружено. **(Б-Г)** Сравнение времени удвоения популяции клеток в период со 2 по 3 **(Б)**, с 3 по 4 **(В)** и с 4 по 5 **(Г)** пассаж. LD Размн.КМ-МСК между 2-м и 3-м пассажами имели значительно меньшую скорость роста (*, $P < 0,05$) по сравнению с пКП-МСК и LD КМ-МСК. В следующих 2 пассажах никаких отличий между разными типами клеток во времени удвоения популяции не наблюдали. **(Д)** Анализ колониобразующих единиц фибробластов (КОЕф) проводили как описано на рис. 3 для культивированных клеток. LD Размн.КМ-МСК во 2-м пассаже характеризовались достоверно более низким уровнем образования КОЕф (*, $P < 0,05$) по сравнению с МСК из трех других источников, взятых для анализа также во 2-м пассаже. Каждый столбик представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение, рассчитанное на основании данных для 3 доноров для МСК из каждого источника. Исследовали следующие типы клеток от таких доноров: LD КМ-МСК (доноры LD1, LD2 и LD3); LD Размн.КМ-МСК (доноры LD4, LD5 и LD6); пКП-МСК и пКМ-МСК (доноры DD1, DD2 и DD3). Характеристики доноров представлены в табл. 1.

Рис. 6. Трехлинейная дифференцировка пКП-МСК и МСК, выделенных из КМ тела позвонка посмертного донора и из КМ, полученного аспирацией из гребня подвздошной кости живых доноров. Для индукции дифференцировки в каждый из типов клеток как

описано в подписи к рис. 3 использовали культуру клеток. Отличий между способностью клеток 3-го пассажа из четырех источников к адипогенной, хондрогенной или остеогенной дифференцировке обнаружено не было. Изображения представляют обобщенные результаты экспериментов с МСК, полученными от трех разных доноров, для каждого типа клеток. Увеличение указано для каждого изображения.

Рис. 7. Суммарный рост популяции пКП-МСК, полученных от 3 разных доноров. пКП-МСК, полученные из подвергнутых ферментативной обработке фрагментов ТП от 3 доноров (DD5, DD6 и DD7), выделяли и размножали до 1 пассажа для формирования главного банка клеток. Часть пКП-МСК от каждого донора после 1 пассажа размножали в течение 9 пассажей. **(А)** Экспериментальные и расчетные значения совокупного выхода пКП-МСК от 3 доноров в каждом пассаже. **(В)** Суммарное удвоение популяции пКП-МСК в 0-9 пассажах. Удвоение популяции рассчитывали на основании исходного количества посеянных клеток и количества клеток, снятых после достижения ими состояния 80% конфлюэнтности в каждом флаконе перед повторным пересевом клеток, и использовали для определения расчетного общего выхода клеток после каждого пассажа. Теоретический общий выход во 2-9 пассажах рассчитывали путем возведения в степень 2 удвоения популяции, рассчитанного для каждого пассажа, и умножения на общее количество клеток из каждого предыдущего пассажа. пКП-МСК от каждого донора в каждом пассаже высевали в трех повторностях. Коэффициент вариации (CV) количества клеток, снятых из разных лунок, не превышал 15%.

Рис. 1

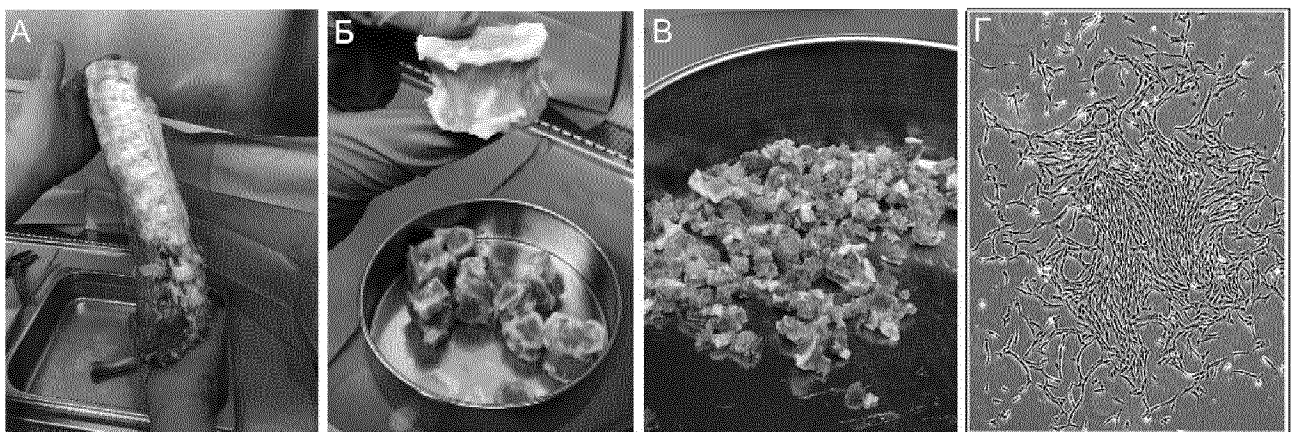


Рис. 2.

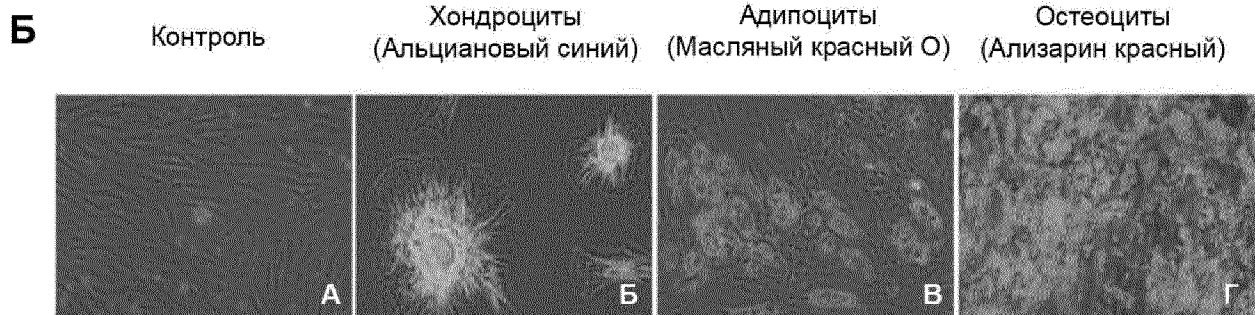
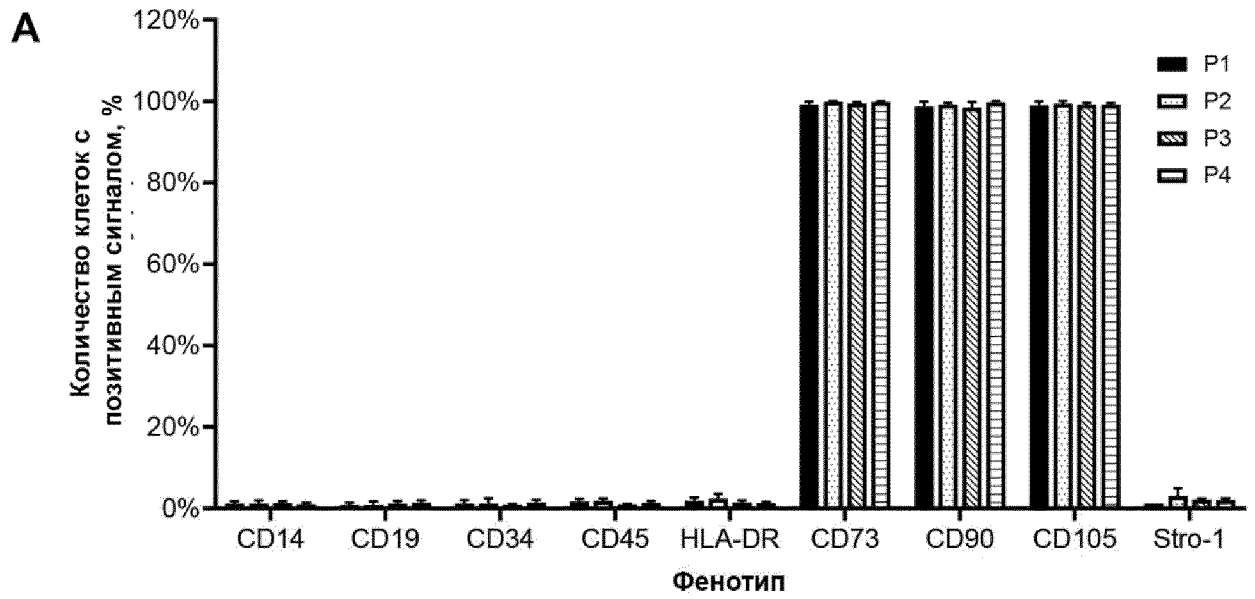


Рис. 3.

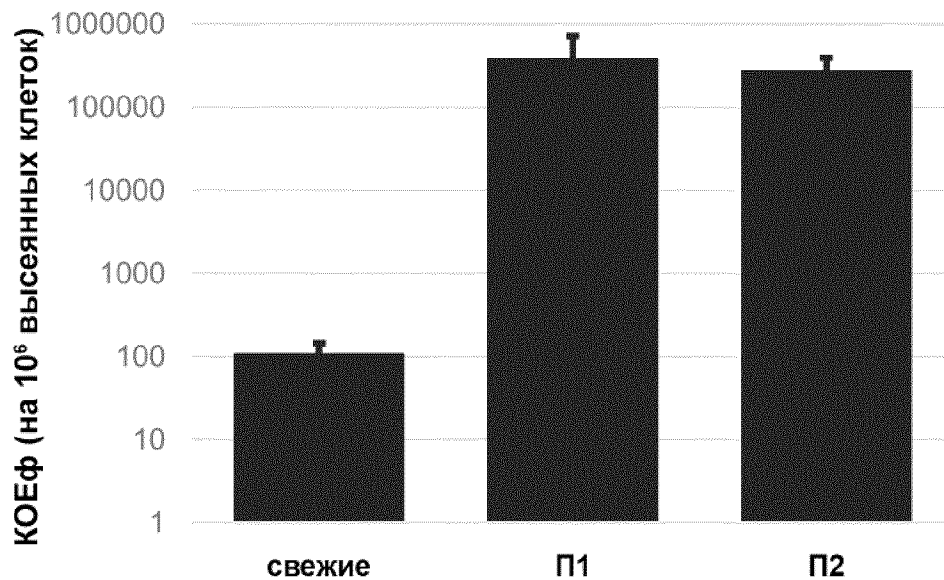


Рис. 4.

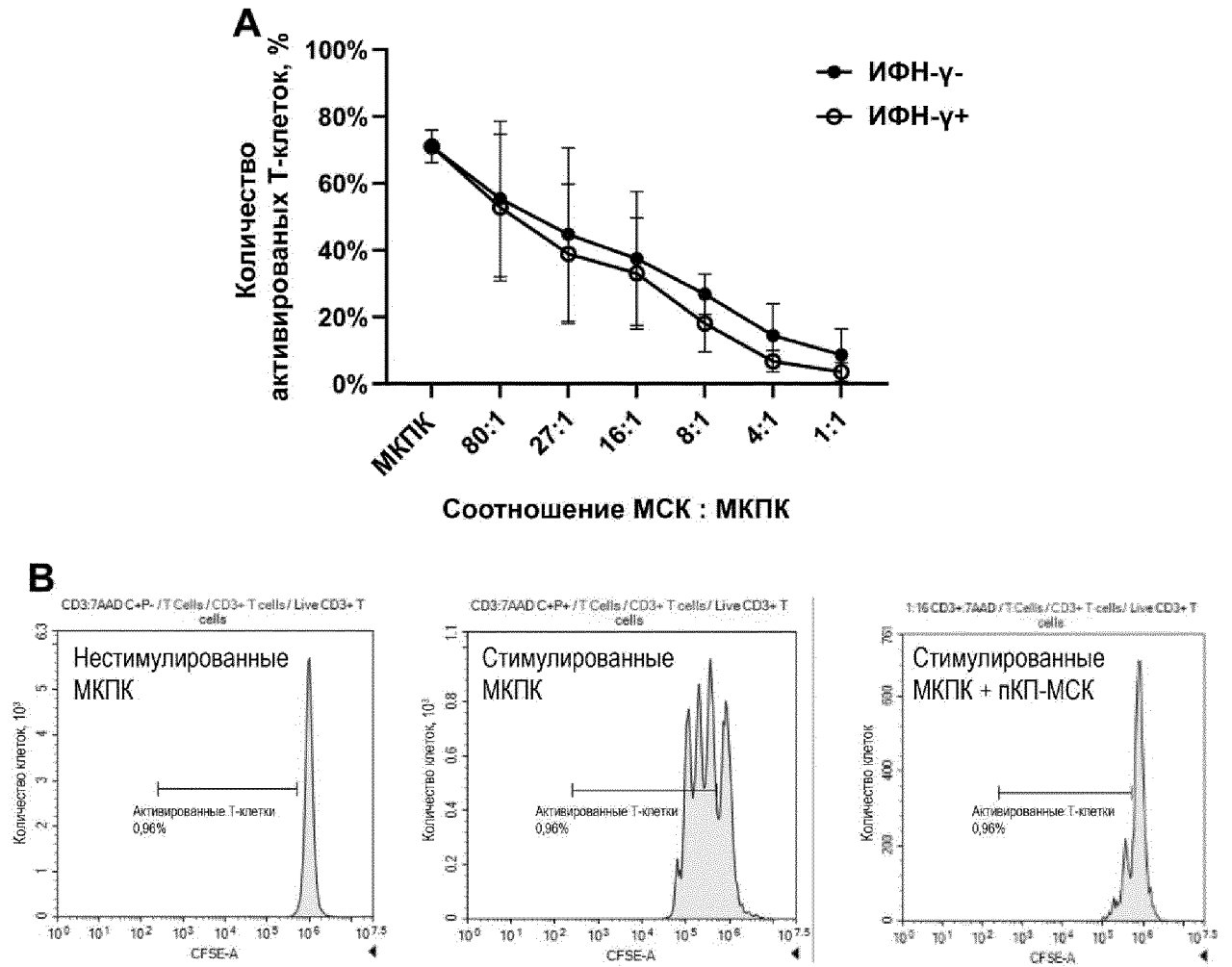


Рис. 5.

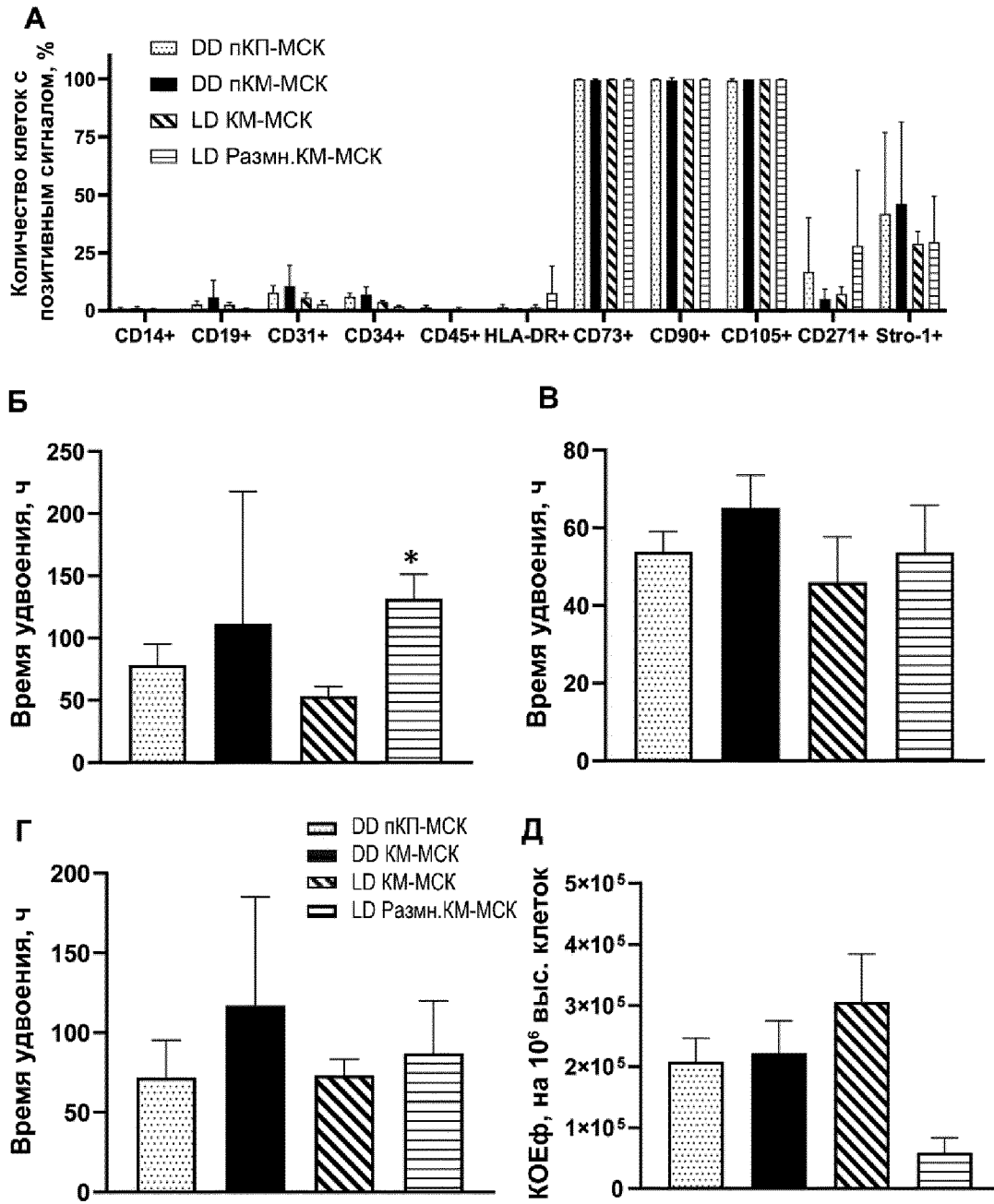


Рис. 6.

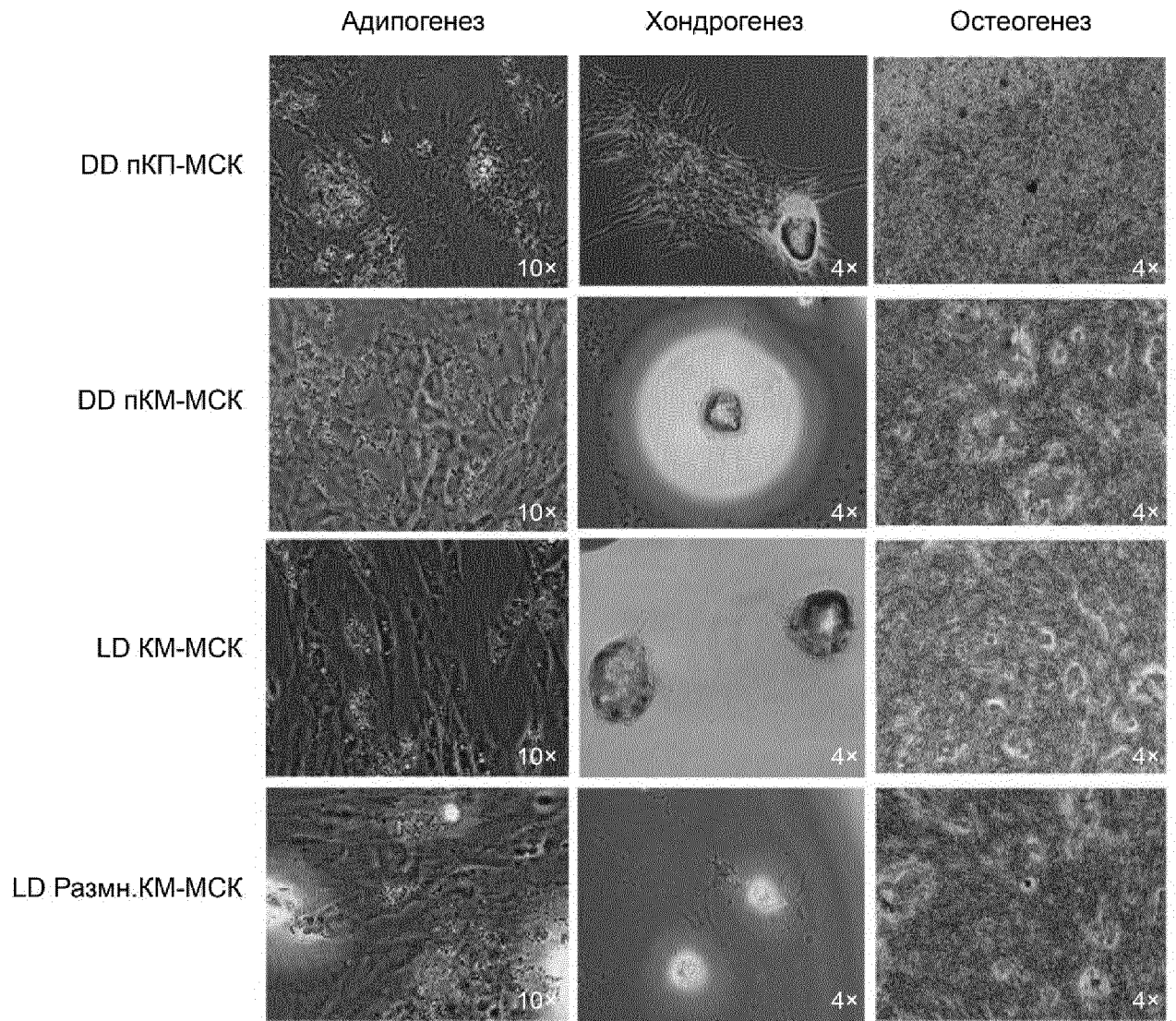
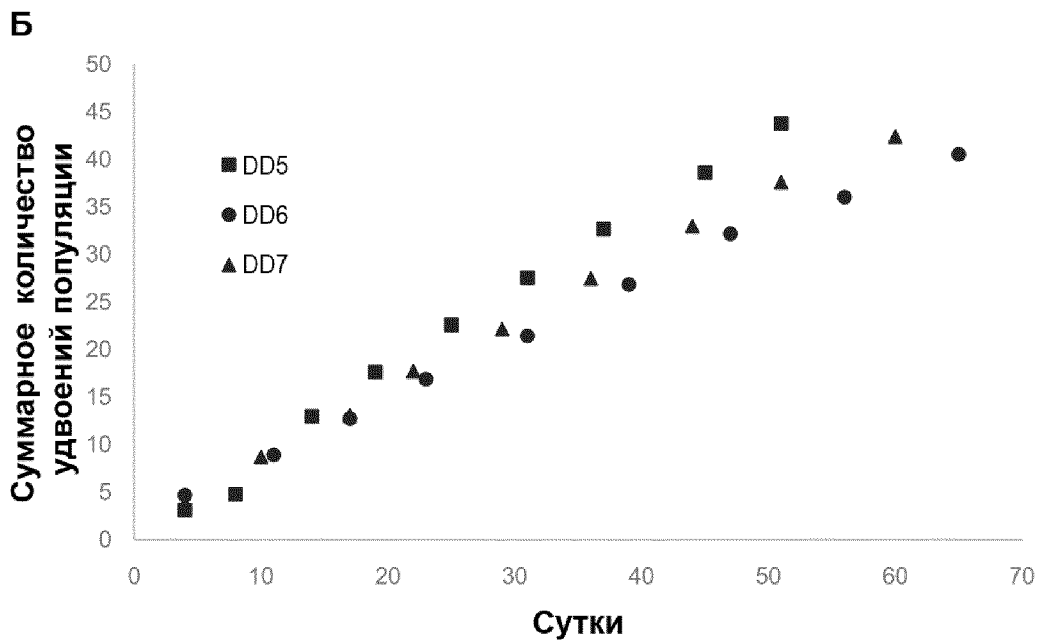
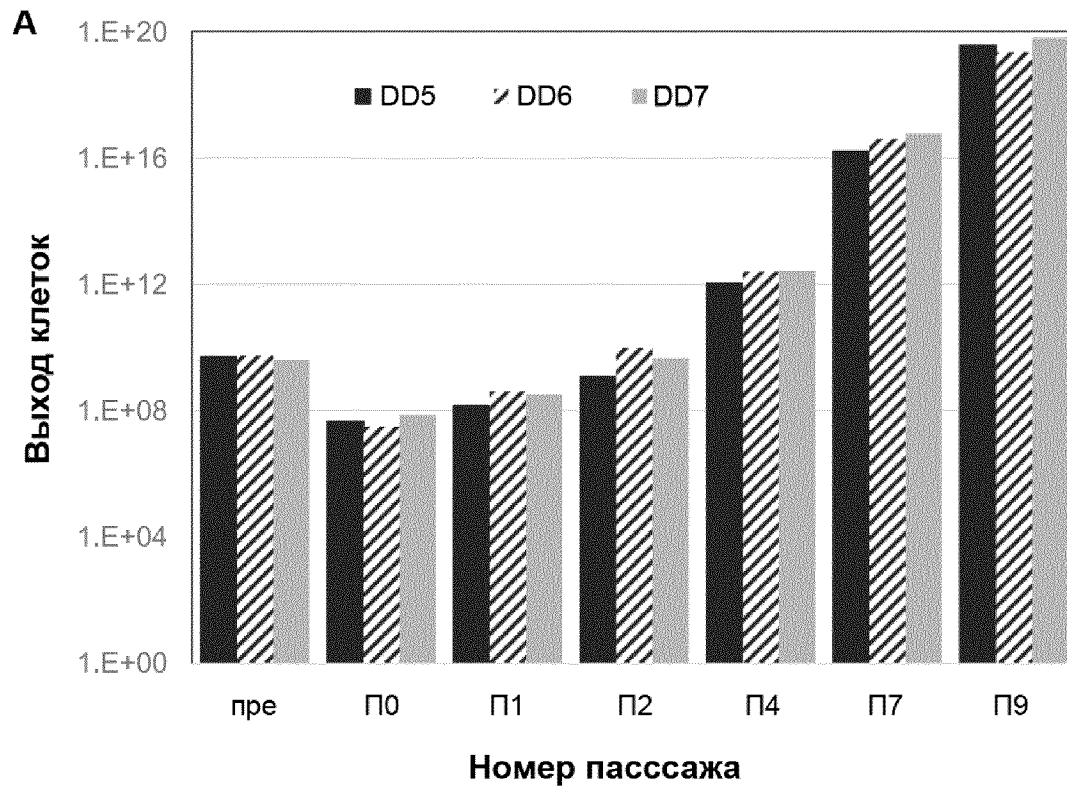


Рис. 7.



REFERENCES

1. Lipsitz, Y.Y., et al., A roadmap for cost-of-goods planning to guide economic production of cell therapy products. *Cytotherapy*, 2017. 19(12): p. 1383-1391.
2. Olsen, T.R., et al., Peak MSC-Are We There Yet? *Front Med (Lausanne)*, 2018. 5: p. 178.

3. Pereira Chilimia, T.D., F. Moncaugeig, and S.S. Farid, Impact of allogeneic stem cell manufacturing decisions on cost of goods, process robustness and reimbursement. *Biochemical Engineering Journal*, 2018. 137: p. 132-151.
4. Simaria, A.S., et al., Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: single-use cell expansion technologies. *Biotechnol Bioeng*, 2014. 111(1): p. 69-83.
5. Harrison, R.P., N. Medcalf, and Q.A. Rafiq, Cell therapy-processing economics: small-scale microfactories as a stepping stone toward large-scale macrofactories. *Regen Med*, 2018. 13(2): p. 159-173.
6. Mizukami, A., et al., Technologies for large-scale umbilical cord-derived MSC expansion: Experimental performance and cost of goods analysis. *Biochemical Engineering Journal*, 2018. 135: p. 36-48.
7. Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999. 284(5411): p. 143-7.
8. Chilima, T.D.P., T. Bony, and S.S. Farid, Designing the optimal manufacturing strategy for an adherent allogeneic cell therapy. *BioProcess International*, 2016. 14(9): p. 24-32.
9. Heathman, T.R., et al., Characterization of human mesenchymal stem cells from multiple donors and the implications for large scale bioprocess development. *Biochemical Engineering Journal*, 2016. 108: p. 14-23.
10. Lechanteur, C., et al., Large-scale clinical expansion of mesenchymal stem cells in the GMP-compliant, closed automated Quantum(R) cell expansion system: Comparison with expansion in traditional T flasks. *Stem Cell Research & Therapy*, 2014. 4(8): p. 1-11.
11. Wuchter, P., et al., Standardization of Good Manufacturing Practice-compliant production of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells for immunotherapeutic applications. *Cytherapy*, 2015. 17(2): p. 128-39.
12. Chinnadurai, R., et al., Immune dysfunctionality of replicative senescent mesenchymal stromal cells is corrected by IFN γ priming. *Blood Adv*, 2017. 1(11): p. 628-643.
13. Mendicino, M., et al., MSC-based product characterization for clinical trials: an FDA perspective. *Cell Stem Cell*, 2014. 14(2): p. 141-5.
14. Lockhart, R.A., J.A. Aronowitz, and S. Dos-Anjos Vilaboa, Use of Freshly Isolated Human Adipose Stroma/ Cells for Clinical Applications. *Aesthet Surg J*, 2017. 37(suppl_3): p. S4-S8.
15. Dykstra, J.A., et al., Concise Review: Fat and Furious: Harnessing the Full Potential of Adipose-Derived Stroma/ Vascular Fraction. *Stem Cells Transl Med*, 2017. 6(4): p. 1096-1108.

16. Donnenberg, A.D., et al., Clinical implementation of a procedure to prepare bone marrow cells from cadaveric vertebral bodies. *Regen Med*, 2011. 6(6): p. 701-6.
17. Ahrens, N., et al., Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. *Transplantation*, 2004. 78(6): p. 925-9.
18. Cox, G., et al., High abundance of CD271(+) multipotential stromal cells (MSCs) in intramedullary cavities of long bones. *Bone*, 2012. 50(2): p. 510-7.
19. Rybka, W.B., et al., Hematopoietic progenitor cell content of vertebral body marrow used for combined solid organ and bone marrow transplantation. *Transplantation*, 1995. 59(6): p. 871-4.
20. Soderdahl, G., et al., Cadaveric bone marrow and spleen cells for transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 1998. 21(1): p. 79-84.
21. Blashki, D., et al., Mesenchymal stem cells from cortical bone demonstrate increased clonal incidence, potency, and developmental capacity compared to their bone marrow-derived counterparts. *J Tissue Eng*, 2016. 7: p. 2041731416661196.
22. Siclari, V.A., et al., Mesenchymal progenitors residing close to the bone surface are functionally distinct from those in the central bone marrow. *Bone*, 2013. 53(2): p. 575-86.
23. Yusop, N., et al., Isolation and Characterisation of Mesenchymal Stem Cells from Rat Bone Marrow and the Endosteal Niche: A Comparative study. *Stem Cells Int*, 2018. 2018: p. 6869128.
24. Jones, E., et al., Large-scale extraction and characterization of CD271+ multipotential stromal cells from trabecular bone in health and osteoarthritis: implications for bone regeneration strategies based on uncultured or minimally cultured multipotential stromal cells. *Arthritis Rheum*, 2010. 62(7): p. 1944-54.
25. Gorantla, V.S., et al., Development and validation of a procedure to isolate viable bone marrow cells from the vertebrae of cadaveric organ donors for composite organ grafting. *Cytotherapy*, 2012. 14(1): p. 104-13.
26. Li, M., et al., Therapeutic Delivery Specifications Identified Through Compartmental Analysis of a Mesenchymal stromal Cell-Immune Reaction. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 6816.
27. Quah, B.J., H.S. Warren, and C.R. Parish, Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc*, 2007. 2(9): p. 2049-56.

28. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*, 2006. 8(4): p. 315-7.
29. Gronthos, s., et al., Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 9): p. 1827-35.
30. Simmons, P.J. and B. Torok-Storb, Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 1991. 78(1): p. 55-62.
31. Dennis, J.E., et al., The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*, 2002. 170(2-3): p. 73-82.
32. Bensidhoum, M., et al., Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCOD mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood*, 2004. 103(9): p. 3313-9.
33. Galipeau, J., et al., International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytherapy*, 2016. 18(2): p. 151-9.
34. Squillaro, T., G. Peluso, and U. Galderisi, Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant*, 2016. 25(5): p. 829-48.
35. Galipeau, J. and L. Sensebe, Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell*, 2018. 22(6): p. 824-833.
36. Jossen, V., et al., Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018. 102(9): p. 3981-3994.
37. Banfi, A., et al., Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*, 2002. 8(6): p. 901-10.
38. Baxter, M.A., et al., Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*, 2004. 22(5): p. 675-82.
39. Bork, s., et al., DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell*, 2010. 9(1): p. 54-63.
40. Bruder, S.P., N. Jaiswal, and S.E. Haynesworth, Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*, 1997. 64(2): p. 278-94.
41. Digirolamo, C.M., et al., Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*, 1999. 107(2): p. 275-81.

42. Muraglia, A., R. Cancedda, and R. Quarto, Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*, 2000. 113 (Pt 7): p. 116 1-6.
43. Redaelli, s., et al., From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of in vitro cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 2012. 3(6): p. 47.
44. Moravcikova, E., et al., Proteomic Profiling of Native Unpassaged and Culture-Expanded Mesenchymal Stromal Cells (MSC). *Cytometry A*, 2018. 93(9): p. 894-904.
45. Baia, J.J., et al., Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells*, 2014. 32(7): p. 1713-23.
46. Choi, Y.H. and J.K. Kim, Dissecting Cellular Heterogeneity Using Single-Cell RNA Sequencing. *Mot Cells*, 2019. 42(3): p. 189-199.
47. Hwang, B., J.H. Lee, and D. Bang, Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mot Med*, 2018. 50(8): p. 96.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б**ВЗАИМОСВЯЗЬ ВРЕМЕНИ ИШЕМИИ ТРАНСПЛАНТАТА И ОХЛАЖДЕНИЯ ВСЕГО ТЕЛА С КАЧЕСТВОМ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА ПОСМЕРТНЫХ ДОНОРОВ ОРГАНОВ**

Эрик Дж. Вудс^{1,2,3}, Обри М. Шерри^{1,2}, Джон Р. Вудс⁴, Джеймс Хардин⁵, Майкл Лафонтейн², Джеральд Брандакер⁶, Брайан Х. Джонстоун^{1,2}

¹Оссиум Хелс Инк., Индианаполис, Индиана, США

²Департамент Биомедицинских Наук, Колледж Остеопатической Медицины, Марианский Университет, Индианаполис, Индиана, США

³Департамент Медицинской и Молекулярной Генетики, Школа Медицины Университета Индианы, Индианаполис, Индиана, США

⁴Школа Общественного Здравоохранения Ричарда М. Фэрбенкса, Университет Индианы, Индианаполис, Индиана, США

⁵Школа Общественного Здравоохранения Арнольда, Университет Южной Каролины, Колумбия, Южная Каролина, США

⁶Департамент Пластической и Реконструктивной Хирургии, Школа Медицины Университета Джона Хопкинса, Балтимор, Мэриленд, США

* Адрес для корреспонденции: Erik J. Woods, PhD, HCLD(ABB), Ossium Health, Inc., 5754 W. 74th St., Indianapolis, IN, 46278, USA. E-mail: Elik.1@OssiumHealth.com

Посмертные доноры органов представляют собой существенный источник костного мозга (КМ), который может быть получен в количестве в 3–5 раз большем, чем полученный от живых доноров, проверен на качество, законсервирован с применением криометода и сохранен на неопределенный срок для последующего использования при необходимости. Однако проблема для будущей системы банков КМ, построенной в генетически разнообразном масштабе, будет состоять в том, чтобы справиться с продолжительными временами хранения трансплантатов, которые неизбежно возникают, когда кости, полученные в географически разнесенных местах, отправляются для обработки на удаленные объекты. Цели настоящего исследования включали: (а) количественную оценку, в реальных и масштабированных условиях получения и транспортировки, взаимосвязи

между временем ишемии трансплантата и качеством гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток (ГСПК), полученных из КМ посмертного донора; (б) определение границ времени ишемии трансплантата, за пределами которых ухудшается качество ГСПК, (в) исследование охлаждения всего тела как тактики сохранения жизнеспособности и функции клеток. Были исследованы кости 62 посмертных доноров после воздействия различных сроков времени тепловой ишемии трансплантата (ВТИТ), времени холодовой ишемии трансплантата (ВХИТ) и времени охлаждения тела (ВОТ). Были разработаны регрессионные модели для количественной оценки независимых ассоциаций ВТИТ, ВХИТ и ВОТ с жизнеспособностью и функциями выделенных ГСПК. Результаты демонстрируют, что в сценариях «реального мира»: (а) легко достижимы комбинации времен тепловой и холодовой ишемии трансплантата, которые благоприятны для выделения высококачественных ГСПК (например, обычно наблюдалась жизнеспособность CD34+ в диапазоне 80–90%); (б) охлаждение тела до выделения костей негативно влияет на жизнеспособность клеток (например, жизнеспособность CD34+ клеток составляла <73% при охлаждении тела по сравнению с >89% без охлаждения); (в) тела позвонков (ТП) являются лучшим источником ГСПК по сравнению с подвздошной костью (ПК) (например, жизнеспособность %CD34+ клеток >80%, если источником были ТП, по сравнению с <74%, когда источником была ПК). Наши количественные модели могут быть использованы для определения допустимых пределов времени ишемии трансплантата и приемлемого уровня качества ГСПК, а также для информирования развивающейся системы банков КМ, стремящейся к установлению отраслевых стандартов на основе полученных данных.

Ключевые слова: костный мозг посмертного донора, банк костного мозга, время ишемии костного мозга, трансплантат гемопоэтических стволовых клеток

Введение

Костный мозг (КМ) посмертного донора представляет собой значительный, неиспользованный источник гемопоэтических стволовых и клеток-предшественников (ГСПК), которые могли бы быть законсервированы с применением криометода и сохранены на неопределенный срок для последующего использования при необходимости в операциях по трансплантации костного мозга (ТКМ). Привлекательность банков КМ частично основана на признании того, что ГСПК могли бы быть доступны немедленно во время резкого роста запросов как, например, при массовых несчастных случаях, таких как ядерная авария, приводящая к общей недостаточности костного мозга [1, 2]. Интерес дополнительно усиливается недавними успехами в стимуляции продолжительной или

оперативной иммунной толерантности посредством инфузии донорских КМ-клеток для установления транзиторного смешанного химеризма и/или периферической иммуномодуляции у реципиентов трансплантатов солидного органа и композитного сосудистого аллотрансплантата (КСАТ) [3–5]. Банк КМ от посмертных доноров органов создает хранилище для будущих процедур стимуляции толерантности с использованием поздних протоколов, которые оказались успешными у нечеловекообразных приматов [6, 7].

Криоконсервация и хранение КМ от посмертных доноров органов потребует создания банков КМ, концептуально схожих с банками пуповинной крови. Как и в случае с пуповинной кровью, хорошо известно, что костный мозг остается биологически функциональным после криоконсервации и может служить генетически разнообразным и оперативным источником трансплантатов стволовых клеток [8–11]. Важно отметить, что национальная сеть Организации трансплантационной координации (ОТК), которая действует в Соединенных Штатах (США) более 50 лет, обеспечивает существующую, хорошо функционирующую инфраструктуру для изъятия и транспортировки костной ткани, выделенной у посмертных доноров. Тем не менее, организация системы получения донорского КМ и системы банков КМ, которая использует существующую инфраструктуру ОТК, потребует скоординированных усилий, включающих получение и безопасную доставку биологического материала в специализированные центры обработки клеток КМ, соответствующим образом масштабируемые для клинического производства.

Критическим вопросом, который обычно не считается значительным в случае живых доноров КМ, является время ишемии трансплантата, которое неизбежно возникает в ходе выделения и транспортировки костей, изъятых у посмертных доноров. Прежде чем масштабировать клиническую производственную систему, необходимо будет определить, как вариации времен тепловой и холодовой ишемии трансплантата повлияют на качество ГСПК, выделенных из костей, полученных в географически разнесенных местах и отправленных на большие расстояния на централизованные обрабатывающие объекты. Кроме того, необходимо будет установить верхние допустимые пределы как для тепловой, так и для холодовой ишемии трансплантата, превышение которых, вероятно, сделает качество и функциональность ГСПК неприемлемыми для терапевтических целей.

Кроме того, необходимо лучше понять влияние охлаждения всего тела на изъятие и транспортировку костей посмертных доноров. Современные рекомендации по тканевым банкам в США допускают изъятие тканей посмертных доноров в течение 24 часов после

асистолии при условии, что тело охладили в течение 12 часов после остановки сердца [12]. Однако охлаждение тела – это переменная, которая не исследовалась систематически в отношении извлечения КМ, и для нее могут потребоваться критерии, отличные от критериев, установленных для извлечения тканей.

Здесь мы впервые представляем наши результаты, которые количественно определяют связь времени ишемии трансплантата и охлаждения всего тела с качеством ГСПК, выделенных из трупных костей позвоночника. Наши анализы показывают, что высококачественные функциональные ГСПК могут быть получены от посмертных доноров даже после того, как извлеченные кости подвергаются кумулятивному времени тепловой и холодовой ишемии, превышающему 40 часов, при условии, что не происходило охлаждения тела, которое, как доказано, является негативным для жизнеспособности. Эти результаты должны быть полезны при установлении допустимых пределов времен тепловой и холодовой ишемии трансплантата и стандартов приемлемости качества ГСПК для КМ, полученного от посмертных доноров органов.

Методы

Дизайн исследования

Это практическое, наблюдательное исследование в реальных условиях, предназначенное для моделирования влияния времен ишемии трансплантата и охлаждения тела на жизнеспособность и функцию ГСПК, извлеченных из КМ посмертных доноров органов [13]. Исследование было разработано для проведения наблюдений, которые можно обобщить и применить в условиях повседневной практики. Внешняя обоснованность (обобщаемость) исследования была усилена за счет участия нескольких ТКМ, работающих в нормальных практических условиях. За исключением специальной подготовки, связанной с деталями изъятия и транспортировки костей (см. ниже), действовали обычные условия по забору трансплантатов. Поскольку ТКМ были географически рассредоточены, собранные данные охватывают полный спектр времен ишемии трансплантата, которые могут присутствовать в «реальных» сценариях забора и транспортировки.

Забор и транспортировка донорских тканей

Ранее разработанные методы клинического изъятия в сочетании с последующим опытом в клиническом исследовании иммунной толерантности к КСАТ трансплантату, которое проводится в Университете Джона Хопкинса (идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT01459107), легли в основу протоколов по забору и транспортировке [4, 14–16]. Тем не

менее, эти протоколы требовали оптимизации и валидации, чтобы гарантировать, что несколько ОТК могут надежно применить их таким образом, чтобы обеспечить стабильный выход функционально жизнеспособных ГСПК после изъятия и транспортировки костей в пределах различных географических районов. С этой целью использовались оптимизированная ОТК процедура изъятия в сочетании со специальными наборами и централизованным обучением процедурам изъятия и транспортировки.

Изъятые кости отправлялись на один из двух обрабатывающих объектов, расположенных в Сентенниале, штат Колорадо (объект А) или в Индианаполисе, штат Индиана (объект Б). Отделы позвоночника (объект А и Б) и/или подвздошные кости (только объект А) были извлечены шестью ОТК: Дар надежды (Итаска, Иллинойс); Альянс доноров (Денвер, Колорадо); Сеть доноров Айовы (Северная Либерти, Айова); Трансплантат Средней Америки (Сент-Луис, Миссури); и Донорская сеть Невады (Лас-Вегас, Невада). Кости были изъяты персоналом ОТК с помощью остеотома и хирургического молотка в соответствии с протоколом, одобренным Экспертным Советом Организации (ЭСО), у доноров органов и тканей для научных исследований. Необработанные кости обертывали марлевыми губками и полотенцами, пропитанными физиологическим раствором, и помещали в пакеты с тройной герметизацией, чтобы обеспечить удержание влаги во время транспортировки. Упакованные образцы в жидком льде были отправлены срочной доставкой на один из двух обрабатывающих объектов.

Ручная очистка

После получения в чистом помещении класса 5 ИСО (объект А) или в боксе биологической безопасности (объект Б) мягкие ткани очищали вручную с помощью скальпелей и желобоватых долот. После визуализации ножек дуг позвонка, их удалили с помощью ленточной пилы для обработки тканей или пилы системы Stryker 6 (Страйкер, Каламазу, Мичиган), сохраняя только соединения тел позвонков. С помощью ножа для извлечения костей (объект Б) или ленточной пилы для обработки тканей (объект А) тела позвонков были разделены на уровне межпозвонковых дисков. Оставшиеся межпозвонковые диски и мягкие ткани удалялись скальпелем, давая чистые, разделенные тела позвонков (ТП). Мягкие ткани подвздошной кости удалялись с помощью желобоватых долот и скальпеля. Были приняты меры, чтобы гарантировать, что кортикальный слой кости не был поврежден, чтобы сохранить и защитить гипоксический КМ губчатой кости в ходе всего процесса очистки.

При помощи пилы и/или секаторов ТП и подвздошная кость разрезались на кусочки размером 5 см³, достаточно маленькие, чтобы их можно было фрагментировать с помощью измельчителя для костей. Кусочки немедленно погружали в 500 мл технологической среды (среда Дульбекко в модификации Искова (СДМИ), содержащая 100 Ед/мл ДНКазы™, 10 Ед/мл гепарина и 2,5% человеческого сывороточного альбумина (ЧСА)). СДМИ подходит для быстро пролиферирующих клеточных культур высокой плотности и идеально подходит для поддержания Т- и В-лимфоцитов. ДНКазы™ необходима для снижения агглютинации клеток в результате высвобождения ДНК из погибающих клеток и посмертного стресса КМ, полученного от посмертных доноров. Гепарин использовался как антикоагулянт. Человеческий сывороточный альбумин являлся источником белка для предотвращения адгезии клеток и их адсорбции на поверхностях.

Измельчение и элюирование

Электрический измельчитель кости был собран в чистом помещении класса 5 ИСО (объект А), а специально изготовленный измельчитель кости (Biogep Technologies Inc., Майами, Флорида) был собран в боксе биологической безопасности (объект Б). На любом из объектов 2 литровый стакан из нержавеющей стали, содержащий 100 мл свежей технологической среды, помещался под головку измельчителя для улавливания костных фрагментов и вытекающей среды. Разные типы костей держались отдельно при обработке ТП и подвздошной кости от одного и того же донора. Технологическая среда использовалась для ополаскивания измельчителя в ходе всего процесса, чтобы предотвратить высыхание и прилипание кости к камере. После измельчения всех кусков кости камеру тщательно промывали свежей технологической средой. Конечный объем содержимого в стакане из нержавеющей стали обычно составлял около 750 мл.

Сита из нержавеющей стали укладывали стопкой с ситом № 40 (425 мкм) поверх сита № 80 (177 мкм) и устанавливали над круглым уловителем (WS Tyler, Сент-Катаринс, Онтарио). Содержимое стакана из нержавеющей стали перемешивали и выливали на сита. Фрагменты кости равномерно распределяли по поверхности сита и промывали 250 мл свежей технологической среды. Пропущенный через сита продукт КМ, приблизительно 1000 мл, переносили в стерильный пакет для окончательного анализа.

Подсчет ядродержащих клеток

В аликвоте экстракта КМ проводили лизис эритроцитов с помощью хлорида аммония, буфера для лизиса эритроцитов. К 1 мл суспензии клеток КМ в 15 мл конической

пробирке добавляли 4 мл 9% хлорида аммония и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. После инкубации лизированный образец доводили до верха пробирки с помощью СДМИ, содержащей 100 Ед/мл ДНКазы™, 10 Ед/мл гепарина и 2,5% ЧСА в технологической среде. Лизированный образец центрифугировали при 300×g в течение 5 минут и декантировали. Затем образец промывали 15 мл технологической среды, центрифугировали при 300×g в течение 5 минут и декантировали. В конце, лизированные клетки ресуспендировали в 1 мл той же технологической среды. Количество жизнеспособных ядросодержащих клеток определяли с использованием трипанового синего и гемоцитометра.

Проточная цитометрия

Проточную цитометрию проводили с использованием проточного цитометра ACEA Biosciences NovoCyte 2060R, оснащенного 488 нм и 640 нм лазерами. Для подсчета клеток CD45⁺ и CD34⁺ использовали методы Международного Общества Гематотерапии и Трансплантологии (МОГТ) [16]. 500 мкл лизированного экстракта костного мозга окрашивали с помощью антител к антигену дифференцировки 45, меченных флуоресцеин изотиоцианатом (CD45-ФИТЦ), антител к антигену дифференцировки 34, меченных аллофикоцианином (CD34-АФЦ), 7-аминоактиномицина D (7-AAD) и аннексина-фикоэритрина (аннексин-ФЭ) (по 2 мкл каждого) в течение 15 минут. Все конъюгированные антитела были приобретены в BD Biosciences, а 7-AAD был получен из Tonbo Biosciences. Клетки также окрашивали индивидуальными конъюгированными антителами для контроля и компенсации. После инкубации в течение 15 минут клетки промывали фосфатным буфером Дульбекко, центрифугировали и ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера. Эти образцы были подвергнуты проточной цитометрии и проанализированы с использованием схемы гейтирования МОГТ [16]. Для каждого образца было собрано 100000 общих событий, гейтированных по синглетному каналу.

Анализ колониеобразующих единиц (КОЕ)

Перед добавлением 250 мкл–2,5 мл полутвердой среды Methocult Optimum (Stem Cell Technologies, Ванкувер, Канада) концентрацию суспензии лизированных эритроцитов доводили до 10⁵ жизнеспособных клеток/мл с помощью технологической среды, а затем энергично вортексировали для достижения надлежащего перемешивания. Шприц объемом 3 см³ использовали для удаления не менее 2,2 мл среды Methocult, содержащей клетки. В каждую из двух 35 мм чашек, не обработанных тканевой культурой, вносили по 1,1 мл среды. Чашки были накрыты и установлены под углом, чтобы обеспечить покрытие всей

поверхности чашек средой Methocult. Эти две чашки помещали в большую чашку Петри диаметром 100 мм с третьей открытой чашкой диаметром 35 мм, содержащей стерильную деионизированную воду для увлажнения чашки. Чашки инкубировали в течение 14 дней при 37 °С в 5% CO₂ до подсчета колоний.

Количество доноров и образцов костного мозга, использованных для статистического моделирования

Семьдесят пять костей от 62 доноров были первоначально получены на одном из двух объектов обработки КМ. Количество выборок с полными записями данных различалось в зависимости от моделируемого результата. В таблице 1 представлена разбивка по результатам для полученных чисел и чисел с полными данными, доступными для статистического моделирования.

Таблица 1 Количество доноров и костей, доступных для анализа по результатам

Всего с полными данными для анализа:

Смоделированный результат	Доноры	Кости	ТП	Подвздошная кость
%CD34+	62	75	52	23
ВСЕГО-КОЕ/10 ⁵	54	67	42	25
КОЕ-ГМ/10 ⁵	54	66	41	25

Определение времени ишемии

Полная ишемия определялась как интервал от момента смерти (когда артериальная система донора пережималась и кровообращение прекращалось) до начала извлечения КМ на обрабатываемом объекте. Для целей статистического моделирования этот общий интервал был разделен на три последовательных и взаимоисключающих временных компонента: (а) время тепловой ишемии трансплантата (ВТИТ): начинающееся в момент смерти и заканчивающееся в момент, когда кости были извлечены и упакованы на льду, или когда тело было помещено в холодильник. (б) Время охлаждения тела (ВОТ): начинающееся в момент, когда тело было помещено в холодильник, и заканчивающееся в момент, когда извлеченные кости помещали на лед. (в) Время холодовой ишемии трансплантата (ВХИТ): начинающееся в момент, когда извлеченные кости были упакованы на льду, и заканчивающееся в момент начала экстракции ГСПК. Согласно этим определениям, общее время ишемии = (ВТИТ) + (ВОТ) + (ВХИТ). Когда охлаждение тела

не применялось, ВОТ кодировался нулем, а общее время ишемии = (ВТИТ) + (ВХИТ). Времена ишемии считались основными переменными, представляющими интерес в прогностических моделях результатов.

Определение опыта

Поскольку это была наша первая серия, в которой обрабатывался КМ из трупной кости, мы предположили, что качество ГСПК может улучшиться с обучением по мере накопления нами большего опыта обработки. Эта гипотеза основана на долгосрочных исследованиях, демонстрирующих, что кривые приобретения опыта оказывают значительное влияние на результаты и затраты как в условиях промышленного производства [17], так и медицинской практики [18–20]. Для контроля обучения мы создали переменную ОПЫТ, определяемую как количество доноров, обработанных до данного донора. Для i -го донора ОПЫТ кодировался как $i-1$, чтобы указать, что ОПЫТ всегда на единицу меньше серийного номера текущего обрабатываемого образца. Поскольку объект А начал обработку КМ на пять месяцев раньше, чем объект Б, и поскольку объект Б имел преимущество участия и обучения на основе образцов, обрабатываемых на объекте А, мы предположили, что эти два объекта будут иметь разные траектории обучения. Чтобы учесть эту возможную разницу, опыт каждого объекта был кодировался отдельно. Чтобы идентифицировать объекты в модели, мы закодировали объект А=1 и объект Б=0. Эффект ОПЫТА первоначально оценивался в отдельных регрессионных моделях, а затем был включен в качестве ковариаты в окончательные скорректированные модели для контроля влияния обучения на результаты.

Другие ковариаты

Другими переменными, протестированными в статистических моделях, были: (1) ТИП КОСТИ, тела позвонков (ТП) и подвздошные кости (ПК) (представляющие два источника клеток КМ, кодированные ТП=1; ПК=0); ПОЛ ДОНОРА (процент мужчин); и ВОЗРАСТ ДОНОРА (лет). Эти дополнительные ковариаты рассматривались как экзогенные факторы и включались в окончательные модели только в том случае, если они были статистически значимыми или улучшали качество модели.

Переменные результата

Результаты были определены в соответствии с тремя критериями качества как отличительными признаками потенциальной применимости *in vivo*: (а) доля полученных клеток CD34+, которые были жизнеспособными (%CD34+), как показано с помощью 7-

ААД; (б) общее количество колониеобразующих единиц (КОЕ) на 10^5 всех высеянных ядродержащих клеток (ЯСК) – (ВСЕГО-КОЕ); (в) количество гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц, обнаруженных в 10^5 ядродержащих клетках (КОЕ-ГМ).

Сводные статистические данные

Характеристики доноров и обрабатываемых объектов, времена ишемии и показатели результатов были обобщены как средние или проценты в зависимости от ситуации. Грубые (нескорректированные) сравнения были сделаны между ОБЪЕКТАМИ (А в сравнении с Б), ТИПОМ КОСТИ (ТП в сравнении с ПК) и ОХЛАЖДЕНИЕМ ТЕЛА (Да или Нет) с использованием *t*-критериев для независимых групп или *z*-критериев для долей.

Статистическое моделирование

Связь продолжительности ишемии с результатами первоначально была исследована на нескорректированных регрессионных моделях с использованием только времен ишемии в качестве прогностических переменных. Затем были оценены дополнительные модели для определения отдельных ассоциаций ОПЫТА с результатами. Наконец, эффекты ишемии были оценены на многомерных моделях, которые контролировали возможное влияние ОБЪЕКТОВ, ОПЫТА, ТИПА КОСТИ, ПОЛА ДОНОРА и ВОЗРАСТА ДОНОРА. Отдельные модели оценивались для каждого из трех представляющих интерес результатов (% CD34+, ВСЕГО-КОЕ и КОЕ-ГМ).

Линейная регрессия методом наименьших квадратов (МНК) использовалась для тестирования ряда моделей-кандидатов, включая модели с двусторонним взаимодействием, а также логарифмическими членами и полиномиальными членами второго порядка. Из этих моделей-кандидатов были отобраны лучшие редуцированные модели на основе следующих критериев. (а) Предпочтение отдавалось моделям с наибольшей объяснительной силой (самые высокие значения R^2). (б) Предпочтение отдавалось простым моделям, объясняющим наибольший процент вариации с наименьшим количеством прогностических переменных. Скорректированное значение R^2 , которое не допускает чрезмерной детализации, выбраковывая модели, содержащие большее количество прогностических переменных [21], использовалось в качестве сравнительного показателя объясняющей способности при выборе наиболее простых моделей. Предпочтение отдавалось моделям, которые достигли самых высоких значений R^2 при одновременном сохранении или

увеличении скорректированного R^2 . (в) Предпочтение отдавалось моделям с большей точностью, на что указывала относительно меньшая стандартная ошибка, связанная как с моделью, так и с коэффициентами модели. (г) Предпочтение отдавалось моделям с наилучшим соответствием, основываясь на оценке графиков остатков. Остатки изображались графически и исследовались визуально на предмет различных закономерностей и количественно подтверждались путем регрессии остатков на наблюдаемые значения для выявления возможных взаимодействий или лежащих в основе нелинейных взаимодействий. Поскольку %CD34+ представляет собой *долю*, ограниченную закрытым единичным интервалом, $[0 \leq (\%CD34+) \leq 1]$, мы обнаружили, что традиционная линейная регрессия МНК дает нереалистичные расчетные значения, превышающие эти границы интервала. Чтобы учесть это, мы заменили линейную регрессию на бета-регрессию в моделях %CD34+ [22]. Бета-регрессия полезна в ситуациях, когда переменная отклика представляет собой степень или долю, измеряемую на непрерывной шкале и ограниченную минимальным и максимальным значениями. Мы смоделировали преобразованную переменную, $pCD34^* = [100 \times (\%CD34+) + 1] / 102$, которая удовлетворяет предположению о распределении бета-регрессии о том, что переменная результата должна быть ограничена открытым интервалом, $[0 < (\%CD34+) < 1]$. Чтобы предсказанные значения могли быть представлены в их исходных процентных единицах, результаты бета-регрессии были преобразованы обратно:

$$\text{Пред}(\%CD34+) = [102 \times (\text{Пред}(pCD34^*)) - 1] / 100$$

(Техническое описание бета-регрессионной модели можно найти ниже в Техническом приложении А).

Проверка модели

Все модели были проверены с использованием перекрестной проверки бутстрапа по принципу исключения по одному [23], выполненной путем случайного исключения одного наблюдения с заменой из набора данных и повторной оценки модели на основе оставшихся наблюдений. Полученная модель затем использовалась для прогнозирования исключенного наблюдения. Эта процедура была повторена 200 раз, в результате чего было получено 200 моделей с предсказанными значениями, коэффициентами модели, стандартными ошибками и 95% доверительными интервалами. Параметры модели были суммированы как средние для 200 бутстрап-моделей. Поскольку бутстрап-модели наивны по отношению к пропущенным наблюдениям, эта форма проверки служит оценкой точности прогноза, которая может быть обнаружена, когда исходная модель используется для прогнозирования новых наблюдений [21]. Коэффициенты модели приводятся для исходных моделей и

сравниваются с усредненными коэффициентами $\pm 95\%$ доверительными интервалами из 200 моделей, прошедших перекрестную проверку.

Результаты

Характеристики образцов представлены в таблице 2, а распределение общих времен ишемии, а также отдельных компонентов времени ишемии ВТИТ, ВХИТ и времени охлаждения тела (ВОТ) для каждого из 62 доноров приведено на Рис. 1. Большинство доноров (77,2%) составляли мужчины. Средний возраст доноров был 41,2 года. Средние времена ишемии в часах (\pm стандартные ошибки) составляли $3,6 \pm 0,4$ для ВТИТ, $7,9 \pm 0,9$ для ВОТ и $19,6 \pm 1,2$ для ВХИТ. Среднее время общей ишемии составило $31,0 \pm 1,2$ часа. В среднем $2,43 \pm 0,64\%$ CD45dim CD34+ ГСПК было получено из образцов КМ, из которых в среднем $79,3 \pm 3,0\%$ были жизнеспособными клетками. КМ содержал в среднем $250,3 \pm 49,48$ ВСЕГО-КОЕ на 10^5 всех высеянных ядродержащих клеток (ЯСК) и $38,2 \pm 7,78$ КОЕ-ГМ на 10^5 всех высеянных ЯСК.

Таблица 2. Характеристики выборки. Числа соответствуют модели %CD34+.

	Среднее/Процент	\pm Стандартная	Мин	Мак
	нт	ая ошибка	.	с.
Тип кости (% позвонков)	65,2%	5,32%	–	–
Пол донора (% мужчин)	77,2%	0,54%	–	–
Возраст донора (лет)	41,2	1,6	13	64
Опыт*	26,9	1,2	0	53
Тепловая ишемия (ч)	3,6	0,4	0,05	13,4
Охлажден ие тела (ч)	7,9	0,9	0	22,5
Холодовая ишемия (ч)	19,6	1,2	7,4	67,8
Общая ишемия (ч)	31,0	1,2	15,3	70,5
Результаты				

%CD34+ жизнеспособность (n=75)	79,3%	3,0%	15,1%	100%
ВСЕГО- КОЕ/10 ⁵ клеток (n=67)	250,3	49,5	0	1850
КОЕ- ГМ/10 ⁵ клеток (n=66)	38,2	7,8	0	282

* Среднее количество образцов, обработанных до настоящего образца

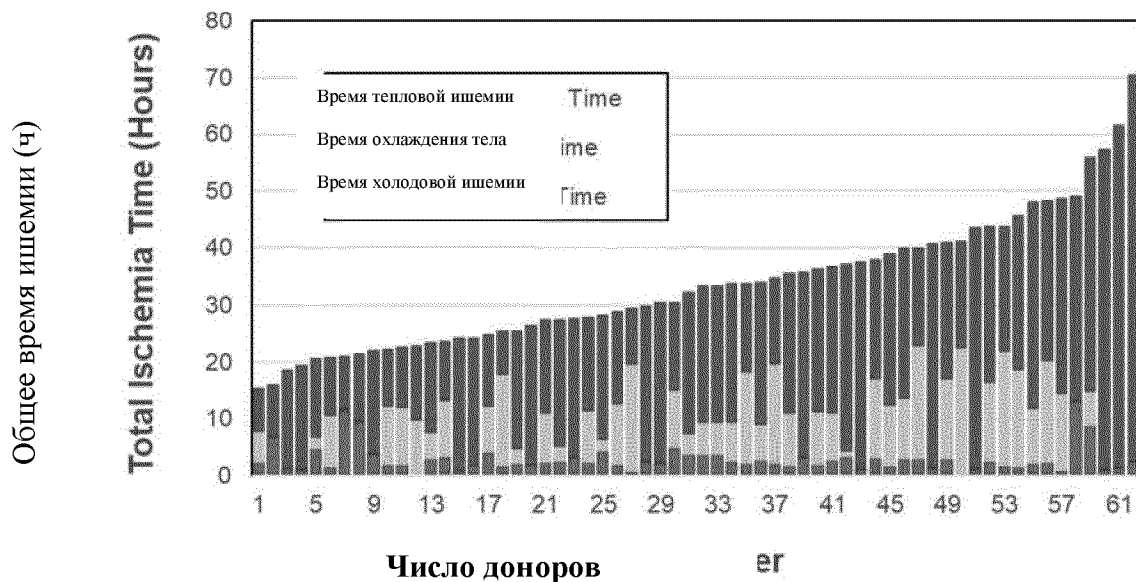


Рисунок 1. Суммарные времена ишемии для всех доноров, использованных в этом исследовании, по которым были доступны полные данные. Доноры ранжируются от самого короткого до самого длинного общего времени ишемии, которое является комбинацией ВТИТ, ВХИТ и ВОТ.

Нескорректированные сравнения

Сравнения ОБЪЕКТОВ, ТИПА КОСТИ и ОХЛАЖДЕНИЯ ТЕЛА показаны в таблице 3. Распределения доноров по возрасту и полу существенно не различались по ОБЪЕКТУ, ТИПУ КОСТИ или от того, использовалось ли ОХЛАЖДЕНИЕ ТЕЛА.

Объекты значительно различались по распределению ТИПОВ КОСТИ (ТП составляли 27% костей, обработанных на объекте А по сравнению со 100% на объекте Б),

что произошло из-за того, что объект Б был организован так, чтобы получать только ТП. Объект А также имел больше опыта (объект А = 53 обработанных кости по сравнению с объектом Б = 24 обработанных кости; $p < 0,00001$), значительно более длительные ВТИТ (объект А = 3,55 часа по сравнению с объектом Б = 2,13 часа; $p = 0,003$) и значительно более короткие ВХИТ (объект А = 19,55 часа по сравнению с объектом Б = 28,38 часа; $p = 0,004$). Эти два объекта не различались ни по ВОТ, ни по общему времени ишемии. Результаты различались только по числу КОЕ-ГМ, при этом на объекте А число КОЕ-ГМ было значительно ниже, чем на объекте Б (28,38 против 64,31, соответственно; $p = 0,04$). Эти два объекта существенно не различались по процентному содержанию жизнеспособных CD34+ или ВСЕГО-КОЕ. Различия объектов контролировались в окончательных регрессионных моделях.

Различия в ВОТ по типу кости (средняя часть таблицы 3) достигали уровня значимости ($p = 0,09$) при обработке ТП, связанной с более короткими ВОТ (6,32 часа) по сравнению с ПК (8,51 часа). Это произошло потому, что объект Б, который обрабатывал только ТП, имел более короткие ВОТ, чем объект А. Результаты также различались по ТИПУ КОСТИ. По сравнению с ПК, ТП давали более высокие значения ВСЕГО-КОЕ (341,29 против 97,44 на 10^5 клеток, соответственно; $p = 0,02$) и КОЕ-ГМ (50,46 против 18,03 на 10^5 клеток, соответственно; $p = 0,04$). ТИП КОСТИ контролировался в окончательных регрессионных моделях.

В случаях, когда тело охлаждали до извлечения костей (правая часть таблицы 3), средние ВТИТ имели тенденцию быть значимо короче (2,65 часа с охлаждением тела по сравнению с 3,98 часа без охлаждения, $p = 0,04$). То же самое верно и для ВХИТ (19,51 часа с охлаждением тела по сравнению с 28,83 часами без охлаждения, $p = 0,009$). Примечательно, что все результаты были хуже, когда использовалось охлаждение тела. Средняя жизнеспособности %CD34+ составляла 72,75% при охлаждении тела по сравнению с 89,86% без охлаждения тела ($p = 0,0001$). Аналогично, среднее число ВСЕГО-КОЕ с охлаждением тела и без него было 100,16 против 659,00 на 10^5 всех высеянных ЯСК, соответственно ($p = < 0,00001$), а среднее число КОЕ-ГМ было 18,52 против 94,85 на 10^5 всех высеянных ЯСК, соответственно ($p < 0,00001$). ОХЛАЖДЕНИЕ ТЕЛА учитывалось как в начальной, так и в конечной регрессионных моделях времени ишемии.

Таблица 3. Сравнение (а) обрабатывающего объекта, (б) типа кости и (в) охлаждения тела

	Объект			Тип кости			Охлаждение тела (Да/Нет)		
	П	К	Р	П	К	Р	Да	Нет	Р
тип кости (%ТП)	7,0%	00%	а				4,7%	9,2%	,18
пол донора (% мужчин)	8,7%	3,7%	,67	4,4%	2,6%	,44	7,8%	7,8%	,95
возраст донора (лет)	1,18	2,44	,65	1,0	2,9	,52	0,78	3,33	,32
опыт	6,86	2,00	0,0000	0,9	4,1	,45	3,74	8,0	,12
тепловая ишемия (ч)	,55	,13	,003	,90	,47	,38	,65	,98	,04
охлажден ие тела (ч)	,95	,09	,08	,32	,51	,09	0,28	,0	-
холодовая ишемия (ч)	9,55	8,38	,004	2,85	1,68	,66	9,51	8,83	,009
общая ишемия (ч)	1,04	5,60	,07	2,07	3,66	,56	2,44	2,82	,91

Результаты									
	%	В	К	0	!	!	!	!	!
CD34+	9,33	6,01	,57	0,17	3,84	,29	2,75	9,86	,0001
Жизнеспособность									
СЕГО-	22,58	25,75	,36	41,29	7,44	,02	00,16	59,00	0,0000
КОЕ/10 ⁵ ЯСК									
ОЕ-	8,38	4,31	,04	0,46	8,03	,04	8,52	4,85	0,0000
ГМ/10 ⁵ ЯСК									

^a Тест значимости не может быть выполнен, поскольку объект Б обрабатывал только позвонки.

ТП = тело позвонка, ПК = подвздошная кость

Регрессионные модели времени ишемии

В нескорректированных (базовых) регрессионных моделях в качестве прогностических переменных использовались только ВТИТ, ВОТ и ВХИТ (без корректировок для других ковариат). Эти модели кратко описаны в онлайн приложении, Техническое приложение В, Таблицы S3–S5. Поскольку было обнаружено, что ТИП КОСТИ, ОБЪЕКТ и ОПЫТ являются значимыми переменными, связанными с результатами (таблица 3), были разработаны скорректированные модели для статистического контроля влияния этих ковариат.

Бета-регрессионная модель, прогнозирующая %CD34+ жизнеспособность, показана в таблице 4. (Детали бета-регрессии представлены в онлайн приложении, Техническое приложение А). Процент жизнеспособных клеток CD34+, которые были выделены, значительно снижался в зависимости от увеличения ВОТ, причем снижение происходило с уменьшающейся скоростью по мере приближения %CD34+ к нулю (линейный эффект, $p=0,002$; эффект полинома второго порядка, $p=0,03$). Аналогичное нелинейное снижение

%CD34+ произошло по отношению к увеличению ВХИТ (линейный эффект, $p=0,003$; полиномиальный эффект второго порядка, $p=0,005$). Ни ТИП КОСТИ, ни ВТИТ не были значимыми. ОПЫТ ($p=0,09$) и взаимодействие ОБЪЕКТ \times ОПЫТ ($p=0,07$) приблизились к статистической значимости. Отношения шансов измеряют изменение %CD34+, связанное с изменением на одну единицу соответствующей прогностической переменной. Например, отношение шансов, связанное с увеличением ВТИТ на один час, составляет 0,9663, что указывает на то, что каждое увеличение ВТИТ на один час снижает %CD34+ до 96,63% от его предыдущего значения. Прогностическая достоверность модели подтверждается сходством оцененных параметров исходной модели (левая часть таблицы 4) с параметрами бутстрап-моделей (правая часть). Модель является статистически значимой ($p=0,001$).

Результаты линейной регрессии ВСЕГО-КОЕ показаны в таблице 5. Здесь становится видна важность ТИПА КОСТИ как источника клеток КМ. Когда клетки КМ были выделены из ТП, а не из ПК, ВСЕГО-КОЕ увеличивалось на $207/10^5$ высеянных ЯСК ($p=0,025$). Эффект ВОТ на ВСЕГО-КОЕ был отрицательным. По мере увеличения ВОТ выделение ВСЕГО-КОЕ снижалось, причем снижение происходило с уменьшающейся скоростью (линейный эффект, $p=0,00005$; эффект полинома второго порядка, $p=0,002$). Эффекты ВТИТ и ВХИТ не были статистически значимыми. ОПЫТ также не был значимым, однако ОПЫТ не подвергался изменению, поскольку качество модели улучшалась, когда ОПЫТ контролировался статистически. Когда ТИП КОСТИ и ОПЫТ контролировались статистически, объяснительная сила модели улучшилась с $R^2 = 35\%$ до 47%. Скорректированный R^2 также улучшился с 35% до 40%, указывая на то, что улучшение не было результатом чрезмерного описания модели. Точность модели также улучшилась, о чем свидетельствовали меньшие стандартные ошибки. Сходство оцененных параметров исходной модели (левая часть таблицы 5) с усредненными результатами бутстрап-моделей (правая часть) свидетельствует о предсказательной достоверности модели. Модель была значимой ($p=0,000005$) и объясняла 47,3% вариации ВСЕГО-КОЕ.

Результаты линейной регрессии КОЕ-ГМ показаны в таблице 6. Лучшая модель КОЕ-ГМ включала ТИП КОСТИ, но не ОПЫТ или ОБЪЕКТ, в качестве контрольных переменных. Хотя ТИП КОСТИ не был статистически значимым, он был сохранен в модели, поскольку его включение улучшало объяснительную силу с $R^2 = 32\%$ до 34%, в то время как скорректированный R^2 остался прежним (29%), что позволяет предположить, что модель не является переопределенной. При статистическом контроле ТИПА КОСТИ, ВТИТ и ВОТ продолжают демонстрировать статистически значимые ассоциации с КОЕ-ГМ.

Каждый час ВТИТ снижает КОЕ-ГМ на $-7,19/10^5$ высеянных ЯСК ($p=0,03$), в то время как каждый час ВОТ снижает КОЕ-ГМ на $-5,24/10^5$ высеянных ЯСК ($p=0,00003$). ВХИТ не оказывало эффекта ($p=0,86$). Прогностическая достоверность модели подтверждается сходством параметров исходной модели (левая часть таблицы б) с усредненными результатами бутстрап-моделей (правая часть). Модель является статистически значимой ($p < 0,00001$) и объясняет чуть менее 34% варибельности КОЕ-ГМ.

Таблица 4. Бета-регрессионная модель %CD34+. Модель показывает влияние тепловой ишемии, охлаждения тела и холодовой ишемии на процент жизнеспособных клеток CD34+ с учетом влияния других ковариат.

Прогнозируемая переменная	Бета регрессионная модель				Перекрестная проверка бутстрапа по принципу исключения по одному					
	Коэфф	Стандарт. ошибка	р	Отн. шансов	Коэфф	Стандарт. ошибка	Z	р	95% ДИ	
β_0 Константа	3,11504	0,71	<0,0001		3,15149	0,86	3,66	<0,0001	1,465	4,838
β_1 Опыт	-0,02482	0,02	0,09	0,9755	-0,02282	0,02	-1,05	0,29	-0,065	0,020
β_2 Объект \times Опыт	0,03203	0,02	0,07	1,0325	0,03023	0,02	1,51	0,13	-0,009	0,070
β_3 Тип кости (ПП=1)	0,22102	0,26	0,40	1,2473	0,21252	0,28	1,21	0,22	-4,225	17,996
β_4 ВТИТ (ч) ^a	-0,03423	0,05	0,52	0,9663	-0,03775	0,06	-0,63	0,53	-0,156	0,080
β_5 ВОТ (ч)	-0,16779	0,05	0,002	0,8455	-0,17062	0,06	-2,67	0,008	-0,296	-0,045
β_6 (ВОТ) ²	0,00592	0,003	0,03	1,0059	0,00609	0,003	1,84	0,06	0,004	0,012
β_7 ВХИТ (ч)	-0,09982	0,033	0,003	0,9050	-0,10165	0,05	-1,87	0,06	-0,208	0,005
β_8 (ВХИТ) ²	0,00144	0,0005	0,005	1,0014	0,00146	0,001	1,27	0,20	-0,0008	0,004

Коэффициент правдоподобия хи-квадрат (8) = 25,20, $p = 0,001$, ИКА = -79,07

^a **Интерпретация:** для тепловой ишемии отношение шансов получается из коэффициента регрессии как $e^\beta = e^{-0,03423} = 0,966$. Отношение шансов показывает, что каждое часовое увеличение времени тепловой ишемии снижает средний процент жизнеспособных клеток CD34+ до 96,6% от его предыдущего значения.

Таблица 5. Линейная регрессия ВСЕГО-КОЕ: влияние тепловой ишемии, охлаждения тела и холодовой ишемии на количество КОЕ/10⁵ ЯСК с учетом влияния объекта, опыта (количество обработанных образцов) и типа кости.

Прогнозируемая переменная	Линейн. регрессионная модель			Перекрестная проверка бутстрапа по принципу исключения по одному					
	Коэфф	Стандарт. ошибка	р	Коэфф	Стандарт. ошибка	Z	р	95% ДИ	
β_0 Константа	160,6034	272,50	0,56	146,9639	242,57	0,61	0,54	-328,46	622,39
β_1 Опыт	2,60499	7,54	0,73	2,89051	5,84	0,49	0,62	-8,56	14,34
β_2 Объект \times Опыт	5,36988	6,46	0,41	4,84149	5,55	0,87	0,38	-6,03	15,72
β_3 Тип кости (ПП=1)	206,9969	90,04	0,025	188,5609	86,93	2,17	0,03	18,18	358,94
β_4 ВТИТ (ч) ^a	-3,73481	19,28	0,85	-0,74672	28,98	-0,03	0,98	-57,54	56,05

β_5 ВОТ (ч)	-82,49506	18,92	0,00005	-81,81929	20,37	-4,02	<0,0001	-121,74	-41,89
β_6 (ВОТ) ²	2,95994	0,92	0,002	2,95785	0,97	3,06	0,002	1,06	4,85
β_7 ВХИТ (ч)	9,55975	12,53	0,45	10,27626	14,74	0,70	0,49	-18,61	39,17
β_8 (ВХИТ) ²	-0,12535	0,18	0,48	-0,12796	0,25	-0,50	0,61	-0,63	0,37

Модель $F_{(8,58)} = 6,51$, $p = 0,000005$, $R^2 = 0,473$, $R^2_{\text{корр}} = 0,40$

^a Интерпретация: Коэффициент линейной регрессии, связанный с тепловой ишемией, показывает, что каждое часовое увеличение ВТИТ снижает количество КОЕ на $-3,73 \times 10^5$ клеток. При средних значениях ВТИТ (2,99 часа), ВОТ (7,81 часа) и ВХИТ (23,14 часа) ожидаемый выход КОЕ составляет $93/10^5$ клеток. Если ВОТ и ВХИТ остаются постоянными на уровне средних значений, увеличение ВТИТ на час с 2,99 до 3,99 часов снизит ожидаемый выход КОЕ с 93×10^5 клеток до $83,89 \times 10^5$ клеток (т.е., $93 - 9,11 = 83,89$).

Таблица 6. Линейная регрессия КОЕ-ГМ: влияние тепловой ишемии, охлаждения тела и холодовой ишемии на количество КОЕ/ 10^5 ЯСК с учетом влияния типа кости.

Прогнозируемая переменная	Линейн. регрессионная модель			Перекрестная проверка бутстрапа по принципу исключения по одному					
	Коэфф	Стандарт. ошибка	p	Коэфф	Стандарт. ошибка	Z	p	95% ДИ	
β_0 Константа	88,3589	27,92	0,002	89,92144	28,05	3,17	0,002	33,95	143,89
β_1 Тип кости (ПП=1)	16,71592	14,00	0,24	16,68794	12,58	1,33	0,18	-7,97	41,35
β_2 ВТИТ (ч)	-7,19329	3,24	0,03	-7,26995	2,70	-2,69	0,007	-12,57	-1,97
β_3 ВОТ (ч)	-5,24410	1,16	0,00003	-5,28080	1,17	-4,52	<0,0001	-7,57	-2,99
β_4 ВХИТ (ч)	0,10750	0,61	0,86	0,09875	0,53	0,18	0,85	-0,95	1,15

Модель $F_{(4,61)} = 7,77$, $p < 0,00001$, $R^2 = 0,338$, $R^2_{\text{корр}} = 0,294$

Прогнозы на основе модели %CD34+

Диапазон прогнозов, созданных на основе скорректированной бета-регрессионной модели из таблицы 4 показан на Рис. 2. Схема прогнозов показывает как различные комбинации ВТИТ и ВХИТ изменяют жизнеспособность выделенных CD34+ клеток. Прогнозы на Рис. 2 являются ожидаемыми результатами при неиспользовании охлаждения тела. Анализ диапазона значений ВТИТ и ВХИТ показывает, что ВТИТ более пагубно для жизнеспособности клеток, чем ВХИТ. Когда ВТИТ составляет до 3 часов или меньше, жизнеспособность CD34+ клеток сохраняется на уровне 80% или выше (зеленая область)

для ВХИТ до 24 часов. Однако при выходе ВТИТ за 3 часа, допустимая продолжительность ВХИТ постепенно снижается. Мы не тестировали эффект криоконсервации, поэтому эти предсказанные значения не учитывают возможную потерю жизнеспособности из-за последующего замораживания и оттаивания выделенных клеток. Аналогичные прогнозы для ВСЕГО-КОЕ и КОЕ-ГМ могут быть сделаны с использованием коэффициентов, представленных в таблицах 5 и 6.

Время холодовой ишемии (ч)

Время тепловой ишемии	Время холодовой ишемии (ч)																																			
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36									
1	90%	89%	88%	88%	87%	86%	86%	85%	84%	84%	83%	82%	82%	81%	81%	80%	80%	80%	79%	79%	79%	78%	78%	78%	78%	78%	78%	78%								
2	89%	89%	88%	87%	86%	86%	85%	84%	84%	83%	82%	82%	81%	81%	80%	80%	79%	79%	79%	78%	78%	78%	78%	78%	78%	78%	78%	78%								
3	89%	88%	87%	87%	86%	85%	85%	84%	83%	83%	82%	81%	81%	80%	80%	79%	79%	78%	78%	78%	78%	77%	77%	77%	77%	77%	77%									
4	89%	88%	87%	86%	86%	85%	84%	83%	83%	82%	81%	81%	80%	80%	79%	79%	78%	78%	77%	77%	77%	77%	76%	76%	76%	76%	76%									
5	88%	87%	87%	86%	85%	84%	84%	83%	82%	82%	81%	80%	80%	79%	79%	78%	78%	77%	77%	77%	76%	76%	76%	76%	76%	76%	76%									
6	88%	87%	86%	86%	85%	84%	83%	83%	82%	81%	80%	80%	79%	79%	78%	78%	77%	77%	76%	76%	76%	75%	75%	75%	75%	75%	75%									
7	87%	87%	86%	85%	84%	84%	83%	82%	81%	81%	80%	79%	79%	78%	77%	77%	76%	76%	76%	75%	75%	75%	75%	75%	74%	74%	74%									
8	87%	86%	85%	85%	84%	83%	82%	82%	81%	80%	79%	79%	78%	77%	77%	76%	76%	75%	75%	75%	74%	74%	74%	74%	74%	74%	74%									
9	87%	86%	85%	84%	83%	83%	82%	81%	80%	79%	79%	78%	77%	77%	76%	76%	75%	75%	74%	74%	74%	73%	73%	73%	73%	73%	73%									
10	86%	85%	85%	84%	83%	82%	81%	80%	80%	79%	78%	77%	77%	76%	76%	75%	75%	74%	74%	73%	73%	73%	73%	73%	72%	72%	72%									

Рисунок 2. Значения, спрогнозированные с использованием бета-регрессионной модели %CD34+, сгенерированной на основе коэффициентов из таблицы 4. Рассчитанные значения в каждом квадрате представляют собой процент жизнеспособных CD34+ клеток, выделенных из цельного КМ. Градиент затенения демонстрирует общую взаимосвязь между ВТИТ и ВХИТ. Зеленая заливка представляет значения жизнеспособности выше 80%, красная заливка ниже 80%, а желтая – около 80% порога. Входные значения, использованные в бета-регрессионной модели для расчета прогнозов жизнеспособности CD34+, были следующими: ВОТ=0 часов (без охлаждения тела); объект Б=0 (Индианаполис); опыт=12 (среднее значение для Индианаполиса); тип кости ТП=0. Значения ВТИТ и ВХИТ варьируются от 10-го до 90-го перцентиля наблюдаемых значений.

Обсуждение

С точки зрения общего числа доноров и количества полученных костей, это практическое, наблюдательное исследование в реальных условиях является крупнейшим на сегодняшний день и первым, в котором количественно определено влияние времен ишемии и охлаждения тела на качество ГСПК, полученных из костей посмертных доноров. Исследование было разработано с целью получения внешне достоверных данных, которые можно было бы обобщить и применить в условиях повседневной практики. Исследование охватывало

полный диапазон времен ишемии, которые могут наблюдаться при нормальных рабочих условиях ОТК, и отличалось от предыдущих исследований, проведенных в отдельных учреждениях, где донорские кости были получены сразу после остановки сердца (то есть без охлаждения тела), с быстрым извлечением костей (т.е. короткий ВТИТ) и без необходимости длительной транспортировки (т.е. сниженный ВХИТ) [4, 14, 15].

Исследование преследовало три основные цели: (а) количественно оценить статистические взаимосвязи между временем ишемии и качеством ГСПК, полученных от посмертных доноров, (б) определить граничные условия, за пределами которых более длительное время ишемии отрицательно влияет на качество ГСПК, и (в) изучить охлаждение всего тела как тактику сохранения функции и жизнеспособности клеток. Результаты исследования передают четыре основных посыла.

Во-первых, приемлемые уровни качества ГСПК достижимы, несмотря на продолжительное время ишемии, которое неизбежно, когда кости должны быть получены на географически разбросанных ОТК и отправлены через всю страну в удаленный обрабатывающий центр. Наш анализ показывает, что в таких условиях легко достижимы благоприятные комбинации времен тепловой и холодовой ишемии, что обеспечивает жизнеспособность CD34+ клеток в диапазоне 80–90%. В целом нескорректированный средний процент полученных жизнеспособных CD34+ клеток составил чуть менее 80% (79,3%, таблица 2).

Второй посыл заключается в том, что охлаждение тела перед изъятием костей, обычная практика при изъятии тканей, пагубно сказывается на жизнеспособности и функционировании ГСПК, полученных из трупного КМ. Когда использовалось охлаждение всего тела, жизнеспособность CD34+ клеток составляла в среднем 72,75%; если охлаждение тела не применялось, средняя жизнеспособность достигала почти 90% (89,96%, таблица 3), что позволяет предположить, что оптимальной практикой было бы отказаться от охлаждения тела и как можно быстрее перенести извлеченную кость в холодную ишемическую среду.

В-третьих, имеет значение источник КМ (тип кости). Наш анализ показывает, что ТП являются лучшим источником жизнеспособных ГСПК по сравнению с ПК. В нескорректированных сравнениях жизнеспособность CD34+ клеток превышала 80%, когда источником был ТП, но упала ниже 74%, когда источником была ПК (таблица 3). Причина такой разницы не ясна и, вероятно, многогранна. Вероятно, что различия в процессах

изоляции, использованных для двух типов костей, были более важным фактором, чем физиологические различия. Учитывая, что это первое исследование, в котором сравнивали КМ из посмертных донорских ТП и ПК, других напрямую сопоставимых данных не существует. Наиболее близким приближением является сравнение жизнеспособности CD34+ клеток, выделенных из КМ посмертных донорских ТП, и аспирированного гребня подвздошной кости живого донора, которые не показали никаких различий [24–26].

Четвертый посыл, который дает наш анализ, заключается в том, что опыт имеет значение и может существенно различаться в разных центрах обработки. Как и в большинстве технических мероприятий, обработка клеток КМ из трупной кости требует обучения. Хорошо известно, что продукты промышленного производства улучшаются по мере обучения – явление, впервые задокументированное более 80 лет назад [27] и впоследствии включенное в стандартные учебники по управлению операциями [17, 28]. В последнее время было показано, что феномен «кривой обучения» распространяется как на результаты, так и на стоимость медицинских процедур [18–20]. Мы наблюдали разные траектории обучения в изученных нами центрах обработки КМ (результаты представлены в Техническом приложении Б), и, хотя мы проанализировали только два центра, наши результаты показывают, что темп обучения и форма кривой обучения могут существенно различаться в зависимости от центров – фактор, который следует учитывать при разработке будущих программ обучения, протоколов обработки КМ и практики сертификации. Наш анализ предполагает, что для обработки КМ существует взаимосвязь «объем-результат» и что крупносерийный региональный центр, накопивший большой опыт обработки, может производить более качественный КМ продукт по сравнению с мелкосерийным центром.

Хотя цель настоящего исследования не заключалась в оптимизации выхода или жизнеспособности, можно провести некоторые сравнения с данными из предыдущих отчетов об изъятии КМ у посмертного донора-человека, целью которых была оптимизация. В трех предыдущих исследованиях сравнивали КМ от в общей сложности 99 посмертных доноров и 58 живых доноров [24–26]. В этих отчетах процент CD34+ клеток из КМ посмертных доноров ($2,1 \pm 0,6\%$; среднее \pm стандартное отклонение) статистически не отличался ($p=0,32$) от процента из КМ, аспирированного у живых доноров ($1,56 \pm 0,92\%$). Это хорошо согласуется с нашими результатами, согласно которым средний процент полученных CD34+ клеток составил $2,43 \pm 0,64\%$ (среднее \pm стандартная ошибка). Мы действительно наблюдали большую вариацию в процентном содержании CD34+, что,

вероятно, отражает экстремальный размах времен ишемии и, следовательно, качество донорской ткани по прибытии в наше исследование.

Качество CD34+ ГСПК от посмертных доноров также сравнивали с ГСПК от живых доноров путем анализа жизнеспособности CD34+ клеток и КОЕ потенциала [24–26]. Средняя жизнеспособность CD34+ клеток, полученных от посмертных доноров, составила $95,2 \pm 3,6\%$ по сравнению с $93,5 \pm 0,35\%$ от живых доноров. Функциональная эквивалентность ГСПК из КМ посмертных и живых доноров была установлена путем сравнения количества КОЕ-ГМ, которая составила 105 ± 65 на 10^5 высевных ЯСК в КМ посмертных доноров по сравнению с $81,4 \pm 17$ на 10^5 высевных ЯСК в КМ живых доноров. Для сравнения, наши общие средние значения для КМ из посмертных доноров (таблицы 2 и 3) были ниже для обоих этих показателей качества, вероятно, опять же из-за крайнего размаха времен ишемии и включения охлаждения тела в наше исследование, что отрицательно повлияло на среднюю жизнеспособность клеток. Впоследствии мы использовали результаты, представленные здесь, для установления пределов в 8 часов по ВТИТ и 30 часов по ВХИТ, и устранили практику охлаждения тела. Следуя этим изменениям в протоколе, позвонки от 50 доноров, отвечающих этим критериям, были извлечены и обработаны (рукопись в стадии подготовки). Средняя жизнеспособность CD34+ ГСПК составила $90,5 \pm 1,9\%$, а среднее значение КОЕ-ГМ составило $158,3 \pm 13,5/10^5$ ЯСК, что сопоставимо с данными предыдущих исследований [24–26].

В целом, наше исследование демонстрирует возможность получения больших объемов КМ от посмертных доноров для банков КМ. Для создания банка КМ с большим разнообразием HLA требуется достаточный источник и устойчивое обеспечение костным мозгом от посмертных доноров. К счастью, Единый закон о дарении органов для трансплантации от 1968 года учредил синдикат из 58 географически распределенных ОТК. Ежегодно около 10000 посмертных доноров жертвуют свои органы, а еще 40000 жертвуют ткани, в результате чего ежегодно получают около 30000 органов и более миллиона тканей (unos.org/data/transplant-trends/ по состоянию на 29 ноября 2019 г.). Большой объем костей, которые потенциально могут быть получены через эту сеть, мог бы обеспечить необходимое количество материала, чтобы оправдать создание интегрированной системы сбора, изъятия и транспортировки костей, связанной с центрами обработки и банками КМ. Интегрированная система этого типа потребовала бы сотрудничества и координации нескольких ОТК, использующих согласованные рабочие протоколы. Наше исследование демонстрирует возможность построения такой системы с использованием существующей

инфраструктуры ОТК. В частности, мы продемонстрировали, что могут быть разработаны и внедрены протоколы для поддержания благоприятной ишемической среды, начиная от точки получения и забора костного материала, через транспортировку по всей стране, и до прибытия в центр обработки КМ. Поскольку наши данные не ограничены для переменных времен охлаждения тела и ишемии, они, вероятно, обладают высоким уровнем внешней достоверности (обобщаемости), а результаты наших прогностических моделей (Рис. 2) могут быть использованы для установления реалистичных допустимых пределов времен ишемии трансплантата и критериев приемлемости качества ГСПК.

Создание системы банков КМ дало бы несколько явных преимуществ по сравнению с существующими реестрами живых доноров. Во-первых, можно было бы избежать личного риска для живых доноров по сравнению лишь с улучшением преобладающей в настоящее время практики сбора мобилизованной периферической крови. Во-вторых, у посмертного донора могут быть извлечены гораздо большие объемы ГСПК, чем у живого донора, что позволяет проводить несколько инфузий от одного и того же донора в случае несостоятельности трансплантата. Кроме того, выделенные клетки могут быть упакованы в известных количествах, проверены на качество и заморожены для последующего использования при необходимости. Поскольку материалы криоконсервированы, они могут храниться неограниченное время [29], тем самым устраняя проблему исчерпания, которая возникает с реестрами живых доноров. Наконец, банк КМ может служить легкодоступным ресурсом во время всплеска спроса после массовых бедствий, таких как ядерная авария, приводящих к общей недостаточности костного мозга [1, 2].

Чтобы эти преимущества были полностью реализованы, необходимо решить множество логистических и системных проблем. Главной из них является признание того, что длительные времена ишемии, возникающие во время изъятия, транспортировки и обработки костей, должны эффективно контролироваться, чтобы гарантировать качество и выход КМ продуктов. КМ банки начинают свое существование и проявляют значительный потенциал. С точки зрения зарождающегося предприятия по обработке КМ результаты наших статистических моделей могут быть использованы для установления количественных допустимых пределов времен ишемии и стандартов приемлемого качества для обеспечения жизнеспособности и функции ГСПК, полученных из трупной кости. С более широкой политической точки зрения, наши модели могут также обеспечить основу для развивающейся системы КМ банков, которая будет вводить отраслевые стандарты на основе полученных данных.

ССЫЛКИ

1. Knebel, A.R., et al., Allocation of scarce resources after a nuclear detonation: setting the context. *Disaster Med Public Health Prep*, 2011. 5 Suppl 1: p. S20-31.
2. Weinstock, D.M., et al., Radiologic and nuclear events: contingency planning for hematologists/oncologists. *Blood*, 2008. 111(12): p. 5440-5.
3. Kawai, T., et al., Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am J Transplant*, 2014. 14(7): p. 1599-611.
4. Schneeberger, s., et al., Upper-extremity transplantation using a cell-based protocol to minimize immunosuppression. *Ann Surg*, 2013. 257(2): p. 345-51.
5. Spitzer, T.R., et al., Twenty Year Follow Up of Histocompatibility Leukocyte Antigen-Matched Kidney and Bone Marrow Co-Transplantation for Multiple Myeloma with End Stage Renal Disease: Lessons Learned. *Transplantation*, 2019.
6. Hotta, K., et al., Long-term Nonhuman Primate Renal Allograft Survival Without Ongoing Immunosuppression in Recipients of Delayed Donor Bone Marrow Transplantation. *Transplantation*, 2018. 102(4): p. e128-e136.
7. Yamada, Y., et al., Overcoming memory T-cell responses for induction of delayed tolerance in nonhuman primates. *Am J Transplant*, 2012. 12(2): p. 330-40.
8. Eckardt, J.R., et al., Comparison of engraftment and acute GVHD in patients undergoing cryopreserved or fresh allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*, 1993. 11(2): p. 125-31.
9. Lioznov, M., et al., Transportation and cryopreservation may impair haematopoietic stem cell function and engraftment of allogeneic PBSCs, but not BM. *Bone Marrow Transplant*, 2008. 42(2): p. 121-8.
10. Stockschrader, M., et al., Use of cryopreserved bone marrow in allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 1995. 15(4): p. 569-72.
11. Stockschrader, M., et al., Use of cryopreserved bone marrow in unrelated allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 1996. 17(2): p. 197-9.
12. AATB, Guidance Document, in Evaluation of Body Cooling at Standard D5.400. 2013, American Association of Tissue Banks: McLean, VA. p. 13.
13. Schwartz, D. and J. Lellouch, Explanatory and pragmatic attitudes in therapeutical trials. *J Chronic Dis*, 1967. 20(8): p. 637-48.
14. Donnenberg, A.D., et al., Clinical implementation of a procedure to prepare bone marrow cells from cadaveric vertebral bodies. *Regen Med*, 2011. 6(6): p. 701-6.

15. Gorantla, V.S., et al., Development and validation of a procedure to isolate viable bone marrow cells from the vertebrae of cadaveric organ donors for composite organ grafting. *Cytherapy*, 2012. 14(1): p. 104-13.
16. Sutherland, D.R., et al., The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother*, 1996. 5(3): p. 213-26.
17. Riahi-Belkaoui, A., *The learning curve: a management accounting tool*. 1986, Westport, Conn.: Quorum Books. xiii, 245 pages.
18. Flood, A.B., W.R. Scott, and W. Ewy, Does practice make perfect? Part 1: The relations between hospital volume and outcomes for selected diagnostic categories. *Medical Care*, 1984. 22(2): p. 98-114.
19. Flood, A.B., W.R. Scott, and W. Ewy, Does practice make perfect? Part II: The relation between volumes and other hospital characteristics. *Medical Care*, 1984. 22(2): p. 115-125.
20. Woods, J.R., et al., The learning curve and the cost of heart transplantation. *Health Serv Res*, 1992. 27(2): p. 219-38.
21. Harrel Jr, F.E., *Regression modeling strategies with applications to linear models, logistic regression, and survival analysis*. 2nd ed. Springer Series in Statistics. 2001, New York: springer. 582.
22. Ferrari, S.L.P. and F. Cribari-Neto, Beta regression for modeling rates and proportions. *J. Applied Statistics*, 2004. 31(7): p. 799-815.
23. Picard, R. and D. Cook, Cross-validation of regression models. *J. Am. Stat. Assoc*, 1984. 79(428): p. 1303-1313.
24. Ahrens, N., et al., Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. *Transplantation*, 2004. 78(6): p. 925-9.
25. Rybka, W.B., et al., Hematopoietic progenitor cell content of vertebral body marrow used for combined solid organ and bone marrow transplantation. *Transplantation*, 1995. 59(6): p. 871-4.
26. Soderdahl, G., et al., Cadaveric bone marrow and spleen cells for transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 1998. 21(1): p. 79-84.
27. Wright, T., Factors affecting the cost of airplanes. *J Aeronautical Sciences*, 1936. 3(2): p. 122-128.
28. Green, J.H., *Operations Management: Productivity and Profit*. 1984: Reston Pub Co. 723.
29. Woods, E.J., et al., Off the shelf cellular therapeutics: Factors to consider during cryopreservation and storage of human cells for clinical use. *Cytherapy*, 2016. 18(6): p. 697-711.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ПРИЛОЖЕНИЕ А

МОДЕЛИ ОПЫТА

Для учета обучения мы создали переменную ОПЫТ, определяемую как количество доноров, обработанных до настоящего донора. Доноры были пронумерованы последовательно $i = 1, \dots, n$ в порядке их обработки, а ОПЫТ был закодирован как $i-1$, чтобы обозначить тот факт, что ОПЫТ всегда был на единицу меньше, чем текущий обрабатываемый донор. Объект А начал обработку костного мозга за пять месяцев до объекта Б и поскольку объект Б имел преимущество участия в обработке материалов на объекте А (и извлечения уроков из них), у этих двух объектов были разные траектории обучения. Чтобы учесть эту разницу, ОПЫТ кодировался отдельно для каждого объекта. Чтобы идентифицировать два объекта в модели, мы закодировали ОБЪЕКТ А = 1 и ОБЪЕКТ Б = 0.

Регрессионная модель:

Результаты (%CD34+, ВСЕГО-КОЕ/10⁵ и ВСЕГО-ГМ/10⁵) были смоделированы как линейные комбинации ОБЪЕКТА (где произошла обработка), ОПЫТА (количество материалов, обработанных на объекте до текущего случая) и взаимодействия ОБЪЕКТ × ОПЫТ. %CD34+ был смоделирован с использованием бета-регрессии (см. Техническое приложение Б). Два других исхода (ВСЕГО-КОЕ и КОЕ-ГМ) были смоделированы с помощью линейной регрессии с использованием метода наименьших квадратов. Модели имели следующую линейную форму:

$$[A.1] \ Y = \beta_0 + \beta_1 (\text{ОБЪЕКТ}) + \beta_2 (\text{ОПЫТ}) + \beta_3 (\text{ОБЪЕКТ} \times \text{ОПЫТ})$$

где: Y = Результат (%CD34+, КОЕ/10⁵, или ГМ/10⁵)

β_0 = Свободный коэффициент (постоянный член)

β_1 = Коэффициент, связанный с ОБЪЕКТОМ

β_2 = Коэффициент, связанный с ОПЫТОМ

β_3 = Коэффициент, связанный с взаимодействием ОБЪЕКТ × ОПЫТ

Коэффициент взаимодействия β_3 учитывает возможность того, что объект А мог бы иметь другую линейную связь с ОПЫТОМ (другая траектория обучения), чем объект Б.

Алгебра для получения проверяемых эффектов

Модель объекта А:

$$[A.2] \ Y = \beta_0 + \beta_1 (\text{ОБЪЕКТ А}) + \beta_2 (\text{ОПЫТ}) + \beta_3 (\text{ОБЪЕКТ А} \times \text{ОПЫТ}) = \beta_0 + \beta_1(1) + \beta_2 (\text{ОПЫТ}) + \beta_3 (1 \times \text{ОПЫТ}) = (\beta_0 + \beta_1) + (\beta_2 + \beta_3) \times (\text{ОПЫТ})$$

Модель для объекта Б сокращена, поскольку ОБЪЕКТ Б = 0 и члены, связанные с β_1 и β_3 , выпадают из модели. Таким образом, модель объекта Б:

$$[A.3] \quad Y = \beta_0 + \beta_1 (\text{ОБЪЕКТ Б}) + \beta_2 (\text{ОПЫТ}) + \beta_3 (\text{ОБЪЕКТ Б} \times \text{ОПЫТ}) = \beta_0 + \beta_1(0) + \beta_2 (\text{ОПЫТ}) + \beta_3 (0 \times \text{ОПЫТ}) = \beta_0 + \beta_1(0) + \beta_2 (\text{ОПЫТ}) + \beta_3(0) = (\beta_0) + (\beta_2) \times (\text{ОПЫТ})$$

Разница между уравнениями [A.2] и [A.3] позволяет понять эффекты, которые можно проверить в модели:

$$[A.4] \quad \text{ОБЪЕКТ А: } Y = (\beta_0 + \beta_1) + (\beta_2 + \beta_3) \times (\text{ОПЫТ})$$

$$\text{–ОБЪЕКТ Б: } Y = (\beta_0) + (\beta_2) \times (\text{ОПЫТ})$$

$$\text{ОБЪЕКТ А – Б : } (\beta_1) + (\beta_3) \times (\text{ОПЫТ})$$

На основе [A.4] следующие эффекты могут быть проверены как нулевые гипотезы:

$H_{01}: \beta_0 = 0$ Проверяет значимость свободного коэффициента для ОБЪЕКТА Б относительно свободного коэффициента, равного нулю. (Результат для ОБЪЕКТА Б при ОПЫТ = 0).

$H_{02}: \beta_1 = 0$ Проверяет значимость свободного коэффициента для ОБЪЕКТА А относительно свободного коэффициента для ОБЪЕКТА Б. (Результат для ОБЪЕКТА А относительно ОБЪЕКТА Б при ОПЫТ = 0).

$H_{03}: \beta_2 = 0$ Проверяет значимость наклона кривой обучения для ОБЪЕКТА Б (изменение результата ОБЪЕКТА Б, связанное с каждым дополнительным ОПЫТОМ обучения).

$H_{04}: \beta_3 = 0$ Проверяет значимость наклона кривой обучения для ОБЪЕКТА А относительно наклона кривой обучения для ОБЪЕКТА Б.

Пример расчета

Ниже приведен рабочий пример для прогнозирования влияния ОПЫТА на КОЕ-ГМ/10⁵ с учетом коэффициентов регрессии и наблюдаемых значений данных, приведенных в таблице S1:

Таблица S1. Коэффициенты регрессии и значения времени ишемии

Коэффициенты линейной регрессии	Прогнозирующая переменная	Наблюдаемые данные
$\beta_0 = 111,91$	Константа	
$\beta_1 = -99,34$	ОБЪЕКТ	A=1; B=0
$\beta_2 = -3,57$	ОПЫТ	20 предыдущих случаев
$\beta_3 = 4,17$	ОБЪЕКТ × ОПЫТ	A=(1 × 20); B=(0 × 20)

Предположим, что ОБЪЕКТ А и ОБЪЕКТ Б обработали 20 предыдущих доноров; каковы будут их соответствующие результаты для 21-го донора?

[А.5] Ожидаемый результат для ОБЪЕКТА Б:

$$\text{КОЕ-ГМ}/10^5 = (\beta_0) + (\beta_2) \times (\text{ОПЫТ}) = 111,91 + (-3,57) \times (20) = 40,51$$

Интерпретация для ОБЪЕКТА Б:

Исходя из отсутствия опыта (ОПЫТ=0), начальный выход КОЕ-ГМ (свободный коэффициент), как ожидается, составит $\beta_0 = 111,91 \text{ КОЕ-ГМ}/10^5$. Затем ожидается, что каждый дополнительный обработанный донор вычитет $\beta_2 = -3,57 \text{ КОЕ-ГМ}/10^5$ из начального значения ОБЪЕКТА Б. Для 21-го обработанного донора ожидаемый выход ОБЪЕКТА Б будет $(\beta_0) + (\beta_2 \times 20) = 111,91 + (-3,57 \times 20) = 40,51 \text{ КОЕ-ГМ}/10^5$.

[А.6] Ожидаемый результат для ОБЪЕКТА А:

$$\begin{aligned} \text{КОЕ-ГМ}/10^5 &= (\beta_0 + \beta_1) \times (\text{ОБЪЕКТ}) + (\beta_2 + \beta_3) \times (\text{ОБЪЕКТ} \times \text{ОПЫТ}) = (111,91 - 99,34) \times (1) \\ &+ (-3,57 + 4,17) \times (1 \times 20) = (12,57) + (0,60 \times 20) = (12,57) + (12,00) = 24,62 \end{aligned}$$

Интерпретация для ОБЪЕКТА А:

При отсутствии опыта выход ОБЪЕКТА А оценивается на $\beta_0 + \beta_1 = [111,91 + (-99,34)] = 12,57 \text{ КОЕ-ГМ}/10^5$ единиц больше, чем на ОБЪЕКТЕ Б. Каждый дополнительный случай, который обрабатывает ОБЪЕКТ А, добавляет $\beta_2 + \beta_3 = (-3,57 + 4,17) = 0,60 \text{ КОЕ-ГМ}/10^5$ к начальному результату ОБЪЕКТА А. Для 21-го обработанного случая результат ОБЪЕКТА А будет $(\beta_0 + \beta_1) + (\beta_2 + \beta_3) \times (20) = 12,57 + (0,60 \times 20) = 24,57 \text{ КОЕ-ГМ}/10^5$. Обратите внимание, что наклон кривой обучения для ОБЪЕКТА А положительный, с добавлением $\beta_3 = 4,17 \text{ КОЕ-ГМ}/10^5$ на каждый дополнительно обработанный случай, в то время как наклон кривой обучения для ОБЪЕКТА Б отрицательный, с вычитанием $\beta_2 = -3,57 \text{ КОЕ-ГМ}/10^5$ для каждого случая. Это пример классического взаимодействия. В относительном выражении каждый дополнительный опыт обучения связан с чистым выигрышем в размере $(\beta_2 + \beta_3) = (-3,57 + 4,17) = 0,60 \text{ КОЕ-ГМ}/10^5$ для ОБЪЕКТА А относительно ОБЪЕКТА Б.

Эти примеры иллюстрируют закономерность, проявившуюся для всех трех результатов. ОБЪЕКТ А, который начал обработку клеток КМ раньше, чем ОБЪЕКТ Б, начинал с относительно более низкого уровня производительности и монотонно улучшал с каждым дополнительным обработанным случаем. Для сравнения, ОБЪЕКТ Б, который участвовал в (и извлекал уроки из) первоначальной работы ОБЪЕКТА А, начал с более высокого

уровня производительности, но не претерпел значительных изменений или немного снизился с увеличением опыта.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ПРИЛОЖЕНИЕ Б

БЕТА-РЕГРЕССИЯ

В основном тексте мы используем $CD34+$ для обозначения количества выделенных клеток $CD34+$ и $\%CD34+$ для обозначения процента жизнеспособных клеток от общего числа $CD34+$ клеток. То есть:

$$\%CD34+ = (\text{жизнеспособные } CD34+)/[(\text{жизнеспособные } CD34+) + (\text{нежизнеспособные } CD34+)]$$

Поскольку это отношение, то $\%CD34+$ ограничен закрытым единичным интервалом ($0 \leq \%CD34+ \leq 1$), что означает, что он может принимать значения 0% или 100% или любое промежуточное значение, но не может быть меньше 0% или больше 100%. Учитывая это ограничение, обычная линейная регрессия с использованием метода наименьших квадратов (МНК) давала нереалистичные подобранные значения, которые выходили за границы интервала – некоторые из предсказанных значений были меньше 0%, а некоторые превышали 100%. Чтобы исправить это, мы рассмотрели бета-регрессию [1] вместо линейной регрессии МНК для моделей $\%CD34+$. Бета-регрессия максимального правдоподобия используется для моделирования случайных величин с бета-распределением, что делает ее особенно полезной в таких ситуациях, как наша, где переменная отклика представляет собой степень или долю, измеряемую на непрерывной шкале и ограниченную минимальным и максимальным значениями. Мы продолжали использовать линейную регрессию МНК для моделирования двух других переменных результата – ВСЕГО-КОЕ и КОЕ-ГМ.

Здесь мы используем $pCD34=\%CD34+$ для обозначения процента выделенных $CD34+$ клеток, которые были жизнеспособными. Чтобы гарантировать, что результат может быть оценен как переменная с бета-распределением, мы преобразовали $pCD34$ следующим образом:

$$pCD34^* = [1 + 100 (pCD34)]/102$$

Это преобразование ограничивает $pCD34^*$ открытым интервалом ($0 < pCD34^* < 1$), тем самым удовлетворяя предположению о характере распределения, что переменная результата может приближаться, но не может равняться 0% или 100%. Затем ограниченную долю $pCD34^*$ моделировали с помощью бета-регрессии. Для простоты интерпретации

предсказанные значения бета-регрессии были подвергнуты обратному преобразованию, что дало:

$$\text{Пред}(pCD34) = [(102 (\text{Пред}(pCD34^*)) - 1) / 100] = \text{Пред}(pCD34) = \text{Пред}(\%CD34+).$$

Уравнение бета-регрессии:

Уравнение бета-регрессии использует логит-функцию связи результата с линейным предиктором η . Наше основное уравнение бета-регрессии для прогнозирования pCD34* было:

$$[Б.1] \quad \eta = \ln[pCD34+ / (1 - pD34+)] = \beta_0 + \beta_1(VTIT) + \beta_2(BOT) + \beta_3(BOT^2) + \beta_4(VXIT) + \beta_5(VXIT^2)$$

Где:

β_0 = Свободный коэффициент (постоянный член)

β_1 = Коэффициент, связанный с временем тепловой ишемии (VTIT)

β_2 = Коэффициент, связанный с временем охлаждения тела (BOT)

β_3 = Коэффициент, связанный с квадратом времени охлаждения тела (BOT²)

β_4 = Коэффициент, связанный с временем холодовой ишемии (VXIT)

β_5 = Коэффициент, связанный с квадратом времени холодовой ишемии (VXIT²)

Пример расчета:

Чтобы проиллюстрировать вычисления, мы используем коэффициенты и времена ишемии, показанные в Таблице S2.

Таблица S2. Коэффициенты регрессии и значения времен ишемии

Коэффициенты бета-регрессии	Прогностическая переменная	Наблюдаемые данные (Времена ишемии)
$\beta_0 = 3,500$	Постоянная	
$\beta_1 = -0,01996$	Время тепловой ишемии (VTIT)	1,92 VTIT часов
$\beta_2 = -0,181$	Время охлаждения тела (BOT)	0,00 BOT часов
$\beta_3 = 0,007$	Квадрат времени охлаждения тела (BOT) ²	0,00 BOT часов ²
$\beta_4 = -0,111$	Время холодовой ишемии (VXIT)	14,92 VXIT часов
$\beta_5 = 0,002$	Квадрат времени холодовой ишемии (VXIT) ²	222,606 часов ²

Используя уравнение [Б.1], мы находим η , как показано ниже в уравнении [Б.2].

$$[Б.2] \quad \eta = \ln[pCD34^* / (1 - pCD34^*)] = \beta_0 + \beta_1(VTIT) + \beta_2(BOT) + \beta_3(BOT^2) + \beta_4(VXIT) + \beta_5(VXIT^2) = 3,500 + (-0,01996) (1,92) + (-0,181) (0) + (0,007) (0) + (-0,111) (14,92) + (0,002) (222,606) = 2,2507688$$

Поскольку они связаны с переменной результата через нелинейную функцию, коэффициенты линейного предиктора η не имеют простого интуитивного значения. Однако, применяя *функцию обратной связи* к η , мы получаем результат, который легче интерпретировать.

Функция обратной связи:

Функция обратной связи $\exp(\eta)/[1 + \exp(\eta)]$ преобразует линейный предиктор η в ожидаемое значение переменной результата $pCD34^*$:

$$E[pCD34^*] = \frac{\exp(\eta)}{[1 + \exp(\eta)]}$$

$$= \frac{\exp[\beta_0 + \beta_1(\text{ВТИТ}) + \beta_2(\text{ВОТ}) + \beta_3(\text{ВОТ}^2) + \beta_4(\text{ВХИТ}) + \beta_5(\text{ВХИТ}^2)]}{1 + \exp[\beta_0 + \beta_1(\text{ВТИТ}) + \beta_2(\text{ВОТ}) + \beta_3(\text{ВОТ}^2) + \beta_4(\text{ВХИТ}) + \beta_5(\text{ВХИТ}^2)]}$$

Применяя функцию обратной связи к прогнозируемому значению $\eta=2,2507688$, вычисленному по уравнению [Б.2], мы получаем ожидаемое значение $E[pCD34^*]$:

$$[Б.3] \quad E[pCD34^+] = \exp(2,2507688)/[1 + \exp(2,2507688)] = 0,905 \approx 90,5\%$$

Этот результат можно интерпретировать как ожидаемое значение $pCD34^*$ для указанных значений прогностических переменных, приведенных в таблице S2.

Чтобы интерпретировать результат [Б.3] с точки зрения $pCD34$ (процент жизнеспособных $CD34^+$ клеток), мы используем обратную трансформацию:

$$[Б.4] \quad pCD34^* = \frac{1 + 100 pCD34}{102} \rightarrow pCD34 = \frac{102 pCD34^* - 1}{100} = \frac{[(102)(0,905) - 1]}{100}$$

$$= 0,9131$$

Уравнение [Б.4] говорит, что для значений, указанных в таблице S1, ожидаемый процент жизнеспособных клеток $CD34^+$ составляет $pCD34 = \%CD34^+ = 91,31\%$.

Определение ожидаемого влияния изменения заданной прогностической переменной на одну единицу на $pCD34^*$:

Коэффициент бета-регрессии для любой данной прогностической переменной можно использовать для оценки воздействия на $pCD34^*$ изменения на одну единицу в этой переменной *с учетом всех других прогностических переменных в уравнении*. Это достигается путем потенцирования конкретного коэффициента регрессии. Например, чтобы рассчитать влияние увеличения времени тепловой ишемии (ВТИТ) на один час на

отношение процента жизнеспособных CD34+ клеток к проценту нежизнеспособных клеток CD34+, рассматриваемое соотношение будет:

$$\frac{p_{CD34^*}}{(1 - p_{CD34^*})} = \frac{\exp(\eta)}{1 + \exp(\eta)} / \left[1 - \frac{\exp(\eta)}{1 + \exp(\eta)} \right] = \exp(\eta)$$

Из таблицы S2 коэффициент регрессии, связанный с ВТИТ, равен $\beta_1 = -0,01996$. Следовательно, влияние увеличения ВТИТ за один час на отношение процента жизнеспособных и нежизнеспособных CD34+ клеток равно:

$$\begin{aligned} \text{[Б. 5]} \quad & \frac{\exp[\beta_0 + \beta_1(\text{ВТИТ} + 1) + \beta_2(\text{ВОТ}) + \beta_3(\text{ВОТ}^2) + \beta_4(\text{ВХИТ}) + \beta_5(\text{ВХИТ}^2)]}{\exp[\beta_0 + \beta_1(\text{ВТИТ}) + \beta_2(\text{ВОТ}) + \beta_3(\text{ВОТ}^2) + \beta_4(\text{ВХИТ}) + \beta_5(\text{ВХИТ}^2)]} \\ & = \exp(-0,01996) = 0,98 \end{aligned}$$

Уравнение [Б.5] говорит, что если бы ВТИТ был увеличен на один час, в то время как другие переменные (ВОТ и ВХИТ) в уравнении остались бы неизменными, отношение процента жизнеспособных к проценту нежизнеспособных клеток CD34+ уменьшилось бы на 2%, до 98% от предыдущего значения. Ранее мы рассчитали $p_{CD34^*} = 0,905$ в уравнении [Б.3]. Таким образом, увеличение ВТИТ на один час снизит p_{CD34^*} до $0,98 \times 0,903 = 0,885$, т.е. на 2%. Эквивалентно, это снизило бы прогнозируемый p_{CD34} с 0,913 до 0,893, примерно на 2%. Мультипликативный коэффициент 0,98 – это постоянная, применимая к любому единичному изменению в непрерывном диапазоне времен тепловой ишемии. Множители для других прогностических переменных могут быть получены таким же образом, чтобы оценить влияние единичного изменения ВОТ и ВХИТ на p_{CD34^*} .

ТЕХНИЧЕСКОЕ ПРИЛОЖЕНИЕ В НЕСКОРРЕКТИРОВАННЫЕ (БАЗОВЫЕ) РЕГРЕССИОННЫЕ МОДЕЛИ ВРЕМЕН ИШЕМИИ

В исходных (базовых) регрессионных моделях мы использовали только ВТИТ, ВОТ и ВХИТ в качестве прогностических переменных (без поправок на другие ковариаты). Результаты этих моделей для %CD34+, ВСЕГО-КОЕ и КОЕ-ГМ показаны в таблицах S3–S5. Результаты моделей показаны в левых частях таблиц; усредненные результаты 200 перекрестно-проверенных моделей (каждая из которых оценивалась с одним наблюдением, исключенным из полного набора данных) показаны в правой части.

Бета-регрессионные модели для %CD34+ показаны в таблице S3. Связь ВТИТ с %CD34+ не была статистически значимой, однако ВОТ (линейный компонент, $p=0,001$ и полиномиальный компонент второго порядка, $p=0,01$) и ВХИТ (линейный компонент, $p=0,001$ и полиномиальный компонент второго порядка, $p=0,004$) были оба нелинейно

связаны с %CD34+. В обоих случаях выход CD34+ снижается в ответ на увеличение ВОТ и ВХИТ, но затем немного увеличивается при верхних предельных значениях ВОТ и ВХИТ. Отношения шансов в S3 представляют собой непрерывно изменяющиеся отношения жизнеспособных CD34+ клеток к общему количеству CD34+ клеток и отражают влияние изменения на одну единицу данной прогностической переменной. Эти величины получаются путем потенцирования коэффициента регрессии, связанного с конкретной рассматриваемой прогностической переменной. Например, коэффициент, связанный с ВТИТ, равен $\beta_1 = -0,01996$ (таблица S3). Потенцирование дает следующий результат:

$$e^{\beta} = e^{-0,01996} = 0,9802 \text{ или } 98,02\%,$$

который представляет собой значение непрерывного отношения шансов для тепловой ишемии, показанной в таблице S3. Этот результат говорит о том, что при постоянных ВОТ и ВХИТ увеличение ВТИТ на каждую единицу (один час) снижает отношение жизнеспособных и нежизнеспособных CD34+ до 98,02% от его предыдущего значения. Мультипликативный коэффициент 0,9802 – это константа, применимая к изменению на одну единицу в любом месте непрерывного диапазона ВТИТ. Множители для других прогностических переменных представлены в таблице S3 и могут использоваться для оценки влияния изменения ВОТ или ВХИТ на одну единицу при постоянных значениях других переменных в уравнении. Бета-регрессионное уравнение прогноза является статистически значимым ($p=0,0009$).

Правая половина таблицы S3 показывает усредненные результаты бутстрепных перекрестных проверок, которые обеспечивают оценки достоверности исходной модели при прогнозировании будущих наблюдений [2]. Если исходная модель была неверно задана, параметры повторно оцененных бутстрэп-моделей будут отличаться от параметров исходной модели. Однако, как показано в таблице S3, параметры модели (коэффициенты регрессии, стандартные ошибки и 95% доверительные интервалы), связанные с исходной моделью (левая часть), почти такие же, как соответствующие параметры, сгенерированные с помощью повторной выборки бутстрапа (правая часть), что свидетельствует о прогностической достоверности исходной модели при ее применении к последующим данным, взятым из той же совокупности. [Технические подробности относительно бета-регрессии и примеров расчетов приведены в Техническом приложении Б выше].

Таблица S4 показывает результаты линейной регрессии для ВСЕГО-КОЕ. Коэффициенты линейной регрессии являются прямыми оценками влияния единичного изменения в соответствующей прогностической переменной. ВОТ является единственной

статистически значимой прогностической переменной в таблице S4. ВТИТ и ВХИТ не являются значимыми. Взаимосвязь ВОТ с ВСЕГО-КОЕ является нелинейной, что указывает на то, что каждое одночасовое увеличение ВОТ *снижает* ВСЕГО-КОЕ на $-95,03639/10^5$ клеток ($p < 0,0001$) при одновременном *увеличении* ВСЕГО-КОЕ² на $3,45603/10^5$ ($p = 0,0008$). Вместе линейные компоненты и полиномиальные компоненты второго порядка создают тенденцию к снижению ВСЕГО-КОЕ, которая уменьшается с замедляющейся скоростью. Параметры модели (левая часть таблицы S4) аналогичны усредненным параметрам бутстрэп-моделей (правая часть), обеспечивая свидетельство прогностической достоверности исходной модели. Эта модель является статистически значимой ($p = 0,00002$) и объясняет 35% дисперсии ВСЕГО-КОЕ.

Таблица S5 показывает результаты линейной регрессии для КОЕ-ГМ. В этой модели влияние ВТИТ и ВОТ статистически значимо, тогда как влияние ВХИТ незначимо. При постоянных значениях ВХИТ и ВОТ каждое увеличение ВТИТ на час снижает КОЕ-ГМ на $-8,11295/10^5$ ($p = 0,01$). При постоянных ВТИТ и ВХИТ каждое увеличение ВОТ на час снижает КОЕ-ГМ на $-5,52927/10^5$ ($p < 0,000009$). Правая часть таблицы S5 показывает, что оценочные параметры бутстрэп-моделей аналогичны параметрам исходной модели, что опять же свидетельствует о прогностической достоверности исходной модели при применении к последующим данным. Эта модель является статистически значимой ($p = 0,00002$) и учитывает 32% от общей вариации количества КОЕ-ГМ.

Таблица S3. Бета-регрессия %CD34+: влияние тепловой ишемии, охлаждения тела и холодовой ишемии на количество жизнеспособных клеток CD34+ в процентах от общего количества CD34+

Прогностическая переменная	Бета регрессионная модель				Перекрестная проверка бутстрапа по принципу исключения по одному					
	Коэфф	Стандартная ошибка	р	Отн. шансов	Коэфф	Стандартная ошибка	Z	р	95% ДИ	
β_0 Константа	3,5001	0,59	<0,0001		3,5455	0,72	4,94	<0,0001	2,14	4,95
β_1 ВТИТ (ч) ^a	-0,01996	0,05	0,71	0,9802	-0,02085	0,06	-0,37	0,709	-0,130	0,089
β_2 ВОТ (ч)	-0,18145	0,05	0,001	0,8341	-0,18498	0,06	-3,21	0,001	-0,298	-0,072
β_3 (ВОТ) ²	0,00664	0,003	0,01	1,0007	0,00680	0,003	2,26	0,02	0,0009	0,013
β_4 ВХИТ (ч)	-0,11148	0,03	0,001	0,8945	-0,11431	0,05	-2,27	0,02	-0,213	-0,016
β_5 (ВХИТ) ²	0,00148	0,0005	0,004	1,0015	0,00106	0,001	1,44	0,15	0,0006	0,0036

Коэффициент правдоподобия хи-квадрат₍₅₎ = 20,81, p = 0,0009, АИК = -80,68

^a Интерпретация: Для тепловой ишемии отношение шансов получается из коэффициента регрессии как $e^{\beta} = e^{-0,019} = 0,98$. Отношение шансов показывает, что каждое увеличение времени тепловой ишемии на один час снижает средний процент жизнеспособных клеток CD34+ на 2% до 98% от его предыдущего значения. Например, при постоянных охлаждении тела и холодовой ишемии увеличение времени тепловой ишемии за один час снизило бы процент жизнеспособных клеток CD34+ на -1,3% от ожидаемого значения 67,6% до 66,3% (т.е. $0,98 \times 67,6\% = 66,3\%$). Отношения шансов для других прогностических переменных получаются таким же образом и имеют ту же интерпретацию.

Таблица S4. Общая линейная регрессия КОЕ: влияние времен тепловой ишемии, охлаждения тела и холодовой ишемии на количество КОЕ на 10^5 клеток

Прогностическая переменная	Линейная регрессионная модель			Перекрестная проверка бутстрапа по принципу исключения по одному					
	Коэфф	Стандартная ошибка	р	Коэфф	Стандартная ошибка	Z	р	95% ДИ	
β_0 Константа	756,5084	169,20	<0,0001	713,8019	150,49	4,74	<0,0001	418,845	1008,758

β_1 ВТИТ (ч) ^a	-9,10826	19,98	0,65	-3,67879	30,92	-0,12	0,90	-64,278	56,921
β_2 ВОТ (ч)	-95,03639	20,02	<0,0001	-92,98267	23,58	-3,94	<0,0001	-139,204	-46,761
β_3 (ВОТ) ²	3,45603	0,98	0,0008	3,39958	1,12	3,04	0,002	1,210	5,589
β_4 ВХИТ (ч)	-4,53349	3,99	0,26	-3,81438	3,82	-1,00	0,32	-11,306	3,678

Модель $F_{(4,62)} = 8,28$, $p = 0,00002$, $R^2 = 0,348$, $R^2_{\text{корр}} = 0,306$

^a Интерпретация: Коэффициент линейной регрессии, связанный с временем тепловой ишемией, показывает, что каждое увеличение времени тепловой ишемии на один час снижает общее количество КОЕ на $-9,11/10^5$ клеток. Если времена охлаждения тела и холодовой ишемии остаются постоянными, то увеличение времени тепловой ишемии на один час снизило бы ожидаемое количество ВСЕГО-КОЕ с $93/10^5$ до $83,89/10^5$ (т.е. $93 - 9,11 = 83,89$).

Таблица S5. Линейная регрессия КОЕ-ГМ: влияние времен тепловой ишемии, охлаждения тела и холодовой ишемии на количество КОЕ на 10^5 ГМ-клеток

Прогностическая переменная	Линейная регрессионная модель			Перекрестная проверка бутстрапа по принципу исключения по одному					
	Коэфф	Стандартная ошибка	p	Коэфф	Стандартная ошибка	Z	p	95% ДИ	
β_0 Константа	104,1805	24,66	<0,00001	104,2596	26,40	3,96	<0,0001	-1,027	1,181
β_1 ВТИТ (ч)	-8,11295	3,16	0,01	-8,10758	2,73	-2,97	0,003	-13,466	-2,759
β_2 ВОТ (ч)	-5,52927	1,14	<0,00001	-5,54669	1,17	-4,74	<0,0001	-7,857	-2,260
β_3 ВХИТ (ч)	0,08872	0,61	0,88	0,08278	0,56	0,14	0,89	-1,027	1,180

Модель $F_{(3,62)} = 9,82$, $p = 0,00002$, $R^2 = 0,322$, $R^2_{\text{корр}} = 0,289$

Ссылки

1. Ferrari SLP, Cribari-Neto F. Beta regression for modeling rates and proportions. *Journal of Applied statistics*. 2004, 31(7):799-815
2. Harrel Jr, F.E., *Regression modeling strategies with applications to linear models, logistic regression, and survival analysis*. 2nd ed. Springer Series in Statistics. 2001, New York: Springer. 582.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ извлечения клеток из костного мозга посмертного донора, предусматривающий:

получение кости от посмертного донора;

обработку кости для извлечения клеток костного мозга из кости;

получение раствора фиколла пониженной плотности с плотностью 1,063–1,052 г/мл;

введение раствора фиколла пониженной плотности в центрифужную пробирку для создания градиента фиколла;

наслоение извлеченных клеток костного мозга на градиент фиколла в центрифужной пробирке;

центрифугирование пробирок, содержащих градиент фиколла и клетки костного мозга;

сбор клеток лейкоцитарной пленки из центрифужных пробирок; и

промывание собранных клеток для последующего использования или обработки.

2. Способ по п. 1, в котором кость представляет собой тело позвонка.

3. Способ по п. 1, в котором собранные клетки представляют собой CD34+ клетки.

4. Способ по п. 1, в котором стадия обработки кости предусматривает:

очистку кости от мягких тканей;

разрезание кости на кусочки, а затем измельчение кусочков;

фильтрацию и промывание измельченных кусочков кости; и

центрифугирование суспензии отфильтрованных и промытых кусочков кости для концентрирования клеток костного мозга.

5. Способ по п. 1, в котором стадия получения фиколла пониженной плотности предусматривает смешивание фиколла-пака плотностью 1,077 г/мл с PLASMA-LYTE™ в определенной пропорции для получения плотности 1,063–1,052 г/мл.

6. Способ по п. 1, в котором стадия центрифугирования пробирок предусматривает центрифугирование пробирок в течение 30 минут при 400g.

7. Способ по п. 1, в котором стадия промывки собранных клеток предусматривает промывку клеток в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS), содержащем 0,5% человеческого сывороточного альбумина (HSA) и 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA).

8. Способ получения клеток костного мозга из кости посмертного донора, предусматривающий:

получение кости от посмертного донора;
очистку кости от мягких тканей;
измельчение кости на кусочки кости;
фильтрацию и промывку измельченной кости для получения жидкой композиции;
центрифугирование жидкой композиции отфильтрованной и промытой
измельченной кости для концентрирования клеток костного мозга в композицию клеток
костного мозга; и

извлечение композиции клеток костного мозга в стерильный контейнер.

9. Способ по п. 8, в котором донорская кость представляет собой одно или несколько тел позвонков и/или подвздошную кость посмертного донора.

10. Способ по п. 8, в котором донорская кость является свежеполученной и не замороженной.

11. Способ по п. 8, в котором донорскую кость размораживают после заморозки для передачи в обрабатывающую установку.

12. Способ по п. 8, в котором стадия очистки кости от мягких тканей предусматривает:

удаление мягких тканей из кости с помощью инструмента; а затем

погружение кости в один или несколько растворов, приспособленных для удаления мягких тканей и клеток мягких тканей из кости.

13. Способ по п. 12, в котором стадия погружения кости в один или несколько растворов предусматривает:

погружение кости в раствор отбеливателя; а затем

погружение кости в раствор перекиси водорода.

14. Способ по п. 12, в котором стадия погружения кости в один или более растворов предусматривает:

погружение кости в контейнер;

определение уровня пены в контейнере; и

повторение по меньшей мере стадии погружения кости в раствор перекиси водорода до тех пор, пока не будет обнаружено отсутствие пены.

15. Способ по п. 14, в котором в раствор перекиси водорода добавляют инертный контрастный краситель для улучшения видимости любой пены в контейнере.

16. Способ по п. 8, в котором стадия измельчения кости предусматривает:

разрезание кости на фрагменты; а затем

измельчение фрагментов кости в костедробилке со средством для измельчения.

17. Способ по п. 16, в котором среда для измельчения содержит PLASMA-LYTE™ в качестве основы с 10 Ед/мл гепарина, 2,5% человеческого сывороточного альбумина (HSA) и 3 Ед/мл реагента Benzonase®.

18. Способ по п. 8, в котором стадия фильтрации и промывки измельченной кости предусматривает:

- погружение измельченной кости в среду для измельчения;
- пропускание измельченной кости и среды для измельчения через ряд сит;
- последующее промывание сит средой для измельчения;
- размещение жидкой композиции, прошедшей через сита, в контейнер; а затем перенос жидкой композиции в стерильный контейнер.

19. Способ по п. 18, в котором ряд сит содержит первое сито № 40 (425 мкм), за которым следует второе сито № 80 (177 мкм).

20. Способ по п. 8, в котором стадия фильтрации и промывки измельченной кости предусматривает:

- погружение измельченной кости в среду для измельчения внутри первого сборного пакета;
- подвешивание первого сборного пакета и соединение дна первого сборного пакета с рядом инфузионных фильтров и вторым сборным пакетом; и
- пропускание содержимого первого сборного пакета через инфузионные фильтры во второй сборный пакет.

21. Способ по п. 20, в котором ряд инфузионных фильтров содержит два фильтра, предусматривающих либо 200-мкм фильтр, либо 500-мкм фильтр.

22. Способ по п. 21, в котором при первом прохождении содержимого первого сборного пакета два фильтра представляют собой 200-мкм фильтры, а при втором прохождении содержимого второго сборного пакета в третий сборный пакет два фильтра представляют собой 500-мкм фильтры.

23. Способ по п. 8, в котором стадия фильтрации и промывки измельченной кости предусматривает удаление содержания жира из измельченной кости.

24. Способ по п. 23, в котором стадия удаления содержания жира из измельченной кости предусматривает:

- помещение суспензии измельченной кости в сборный пакет;
- центрифугирование сборного пакета так, чтобы в верхней части сборного пакета образовался слой жира, когда он подвешен; и
- удаление осадка костного мозга из нижней части подвешенного сборного пакета.

25. Способ по п. 24, в котором перед извлечением осадка на пакет под слоем жира помещают зажим, чтобы зажать пакет и предотвратить прохождение слоя жира при извлечении осадка.

26. Способ по п. 8, дополнительно предусматривающий стадию криоконсервации композиции клеток костного мозга.

27. Способ по п. 26, в котором стадия криоконсервации композиции клеток костного мозга предусматривает:

подготовку заранее определенного объема среды для замораживания в виде раствора среды для промывки и криоконсервирующей композиции; и

введение среды для замораживания в стерильный контейнер, содержащий композицию клеток костного мозга, с заранее определенной скоростью.

28. Способ по п. 27, в котором стерильный контейнер содержит 60–70 мл композиции клеток костного мозга, а заранее определенный объем среды для замораживания определен по объему композиции клеток костного мозга.

29. Способ по п. 27, в котором заранее определенная скорость составляет десять процентов (10%) заранее определенного объема среды для замораживания в минуту.

30. Способ по п. 27, в котором криоконсервирующая композиция может представлять собой одну или несколько композиций, выбранных из группы, включающей: диметилсульфоксид (DMSO); 1,2-пропандиол; этиленгликоль; глицерин; форамид; этандиол или бутан-2,3-диол; гидроксипропилкрахмал (HES), декстран, сахарозу, трегалозу, лактозу, раффинозу, рибитол, маннитол и поливинилпирролидон (PVP).

31. Способ по п. 27, в котором среда для промывания может представлять собой одну или несколько композиций, выбранных из группы, включающей: PlasmaLyte; Isolyte и IMDM.

32. Способ по п. 27, в котором среда для замораживания дополнительно содержит оксиразу.

33. Инструмент для резки кости, содержащий:

неподвижную рукоятку, содержащую конец, выполненный с возможностью захвата пользователем, и противоположный зажимной конец, причем указанная неподвижная рукоятка определяет углубление для захвата кости на указанном зажимном конце;

нажимную рукоятку, шарнирно соединенную на первом шарнире с неподвижной рукояткой для поворота в сторону к неподвижной рукоятке и от нее и выполненную с возможностью захвата пользователем при захвате неподвижной рукоятки для последовательного поворота нажимной рукоятки в сторону неподвижной рукоятки;

ножевой элемент, шарнирно соединенный на втором шарнире с неподвижной рукояткой и содержащий режущую кромку, обращенную к указанному углублению для зацепления кости на зажимном конце неподвижной рукоятки; причем ножевой элемент содержит храповой компонент, расположенный между указанной неподвижной рукояткой и указанной нажимной рукояткой; причем указанный храповой компонент содержит множество зубцов;

собачку, шарнирно соединенную на третьем шарнире с указанной нажимной рукояткой и выполненную с возможностью зацепления каждого из указанных множества зубцов при каждом последующем повороте пользователем указанной нажимной рукоятки относительно указанной неподвижной рукоятки,

причем каждый из указанного первого шарнира содержит удлиненный штифт, проходящий через отверстия в указанной неподвижной рукоятке и указанной нажимной рукоятке, указанный второй шарнир содержит удлиненный штифт, проходящий через отверстия в неподвижной рукоятке и ножевом элементе, и указанный третий шарнир содержит удлиненный штифт, проходящий через отверстия в поворотной рукоятке и собачке, и

причем каждый штифт удерживается с возможностью извлечения в соответствующем первом, втором и третьем шарнире по меньшей мере одним съемным стопорным кольцом таким образом, что неподвижная рукоятка, поворотная рукоятка, ножевой элемент и собачка могут быть легко сняты для очистки и снова установлены после очистки.

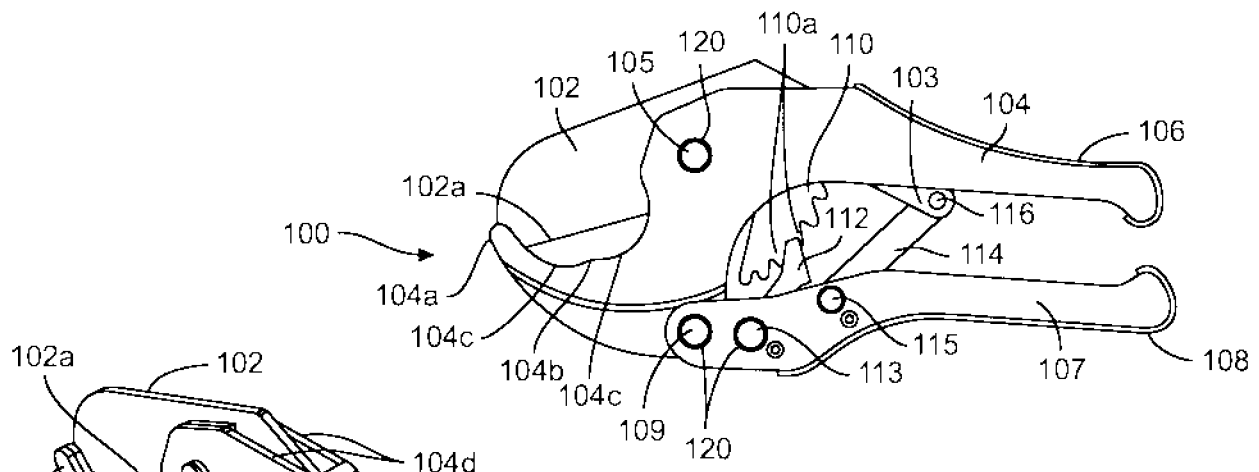
34. Инструмент для резки кости по п. 33, в котором:

ножевой элемент содержит встроенную тягу; и

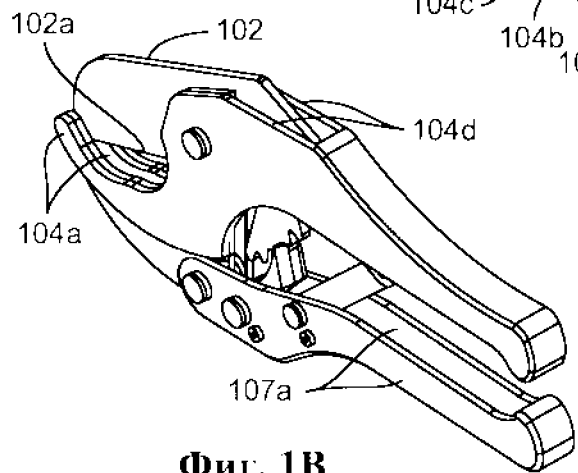
инструмент дополнительно содержит свободную тягу, шарнирно соединенную с нажимной рукояткой на четвертом шарнире и шарнирно соединенную с указанной встроенной тягой, причем указанный четвертый шарнир содержит удлиненный штифт, проходящий через отверстия в нажимной рукоятке и свободной тяге для простой разборки.

35. Инструмент для резки кости по п. 33, в котором неподвижная рукоятка, ножевой элемент, поворотная рукоятка, собачка и свободная тяга изготовлены из нержавеющей стали, а их поверхности пассивированы.

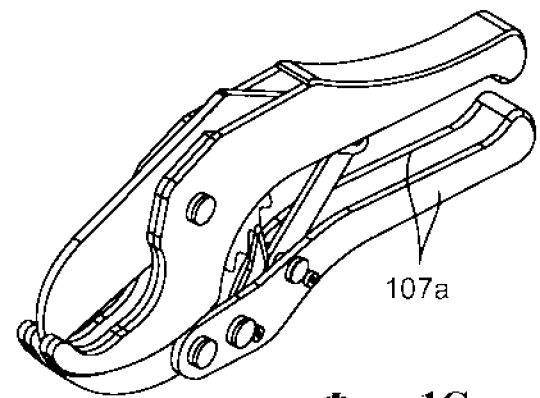
36. Инструмент для резки кости по п. 35, в котором нержавеющая сталь представляет собой закаленную нержавеющую сталь.



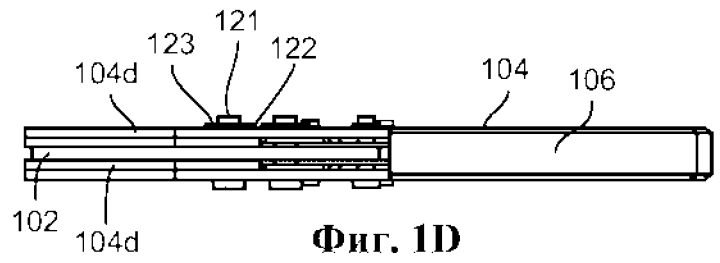
Фиг. 1А



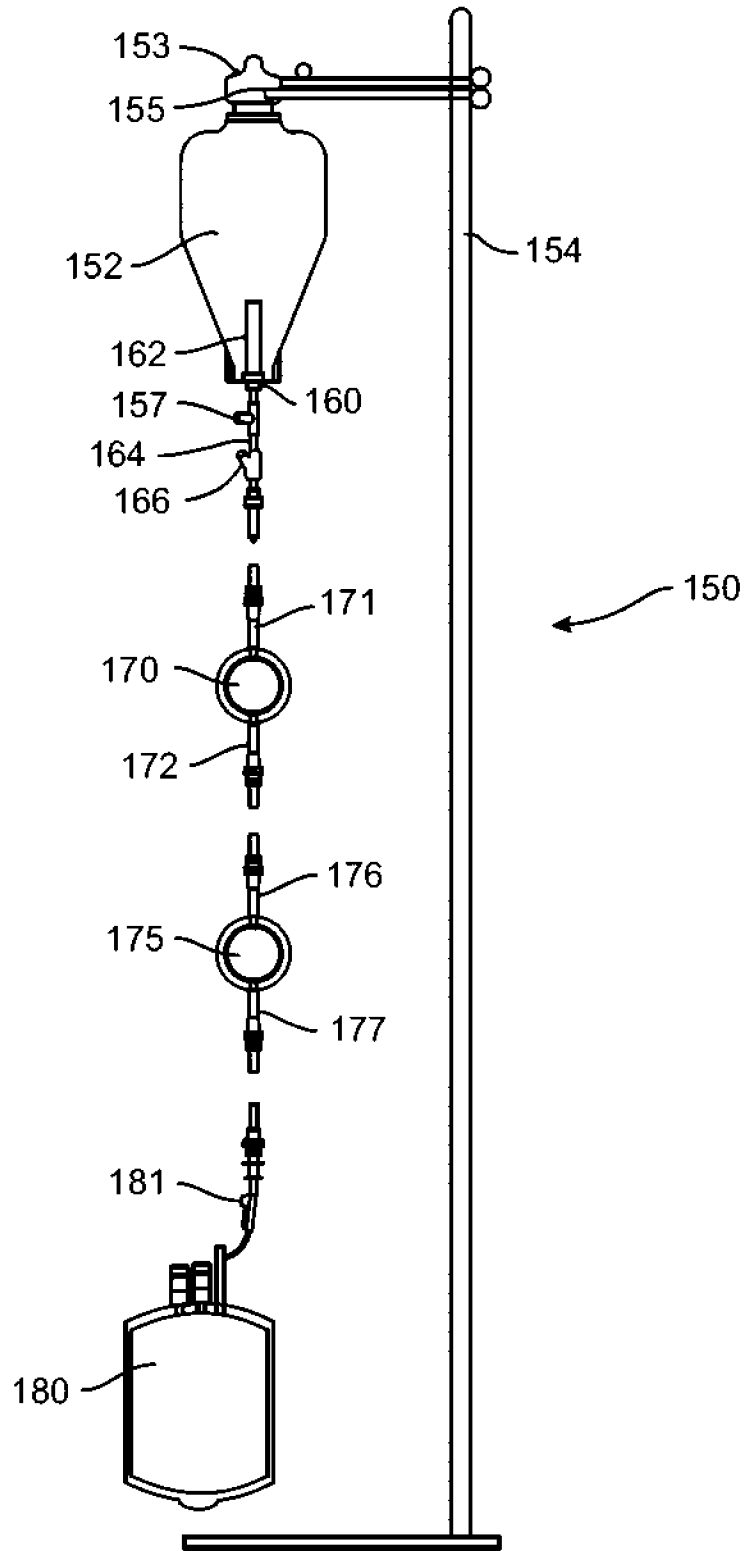
Фиг. 1В



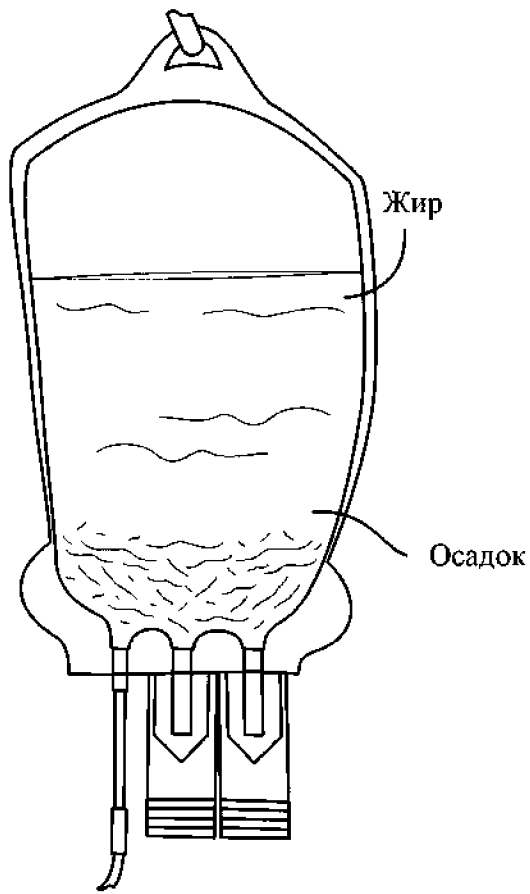
Фиг. 1С



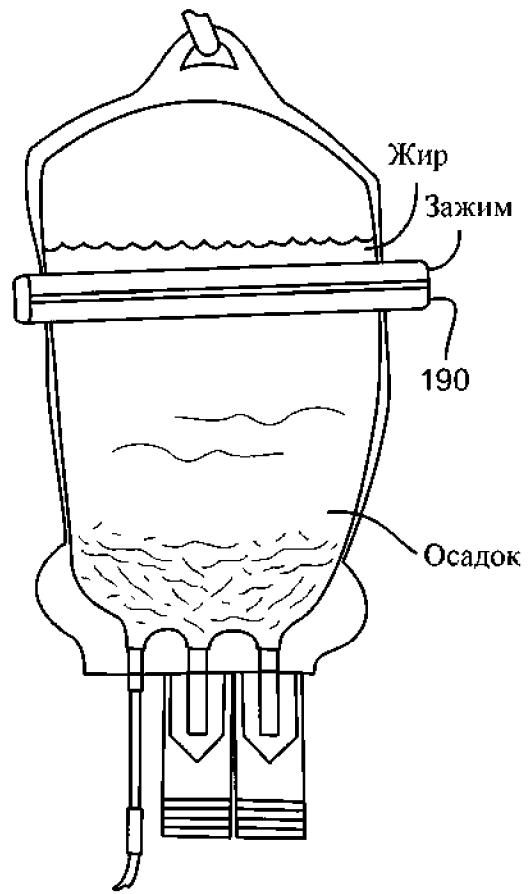
Фиг. 1D



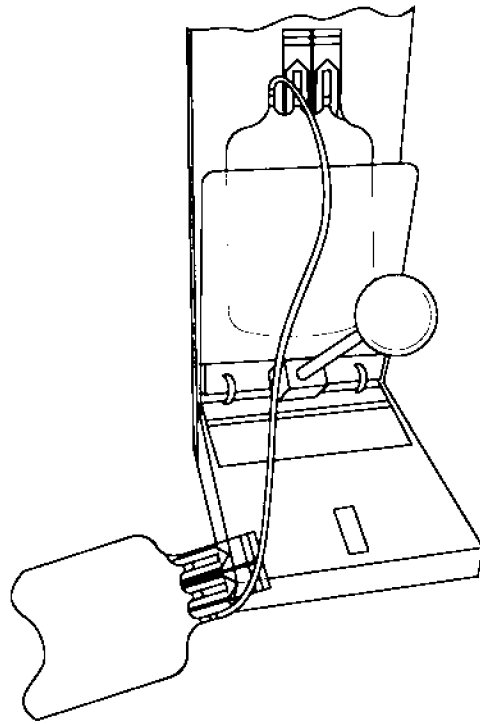
Фиг. 2



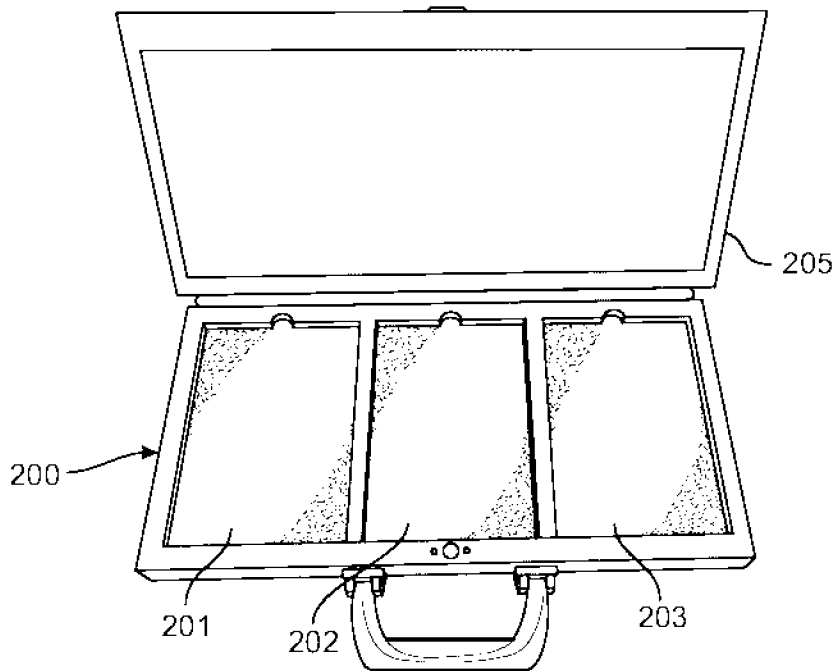
Фиг. 3



Фиг. 4

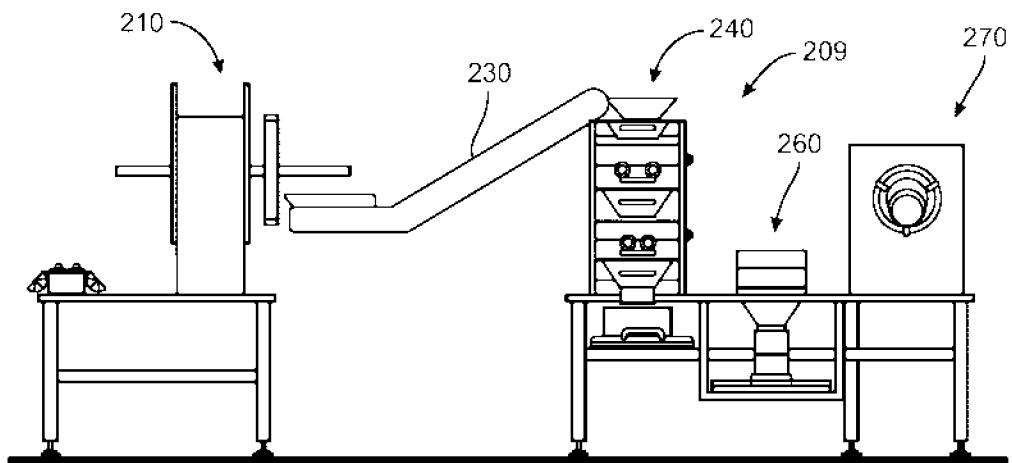


Фиг. 5

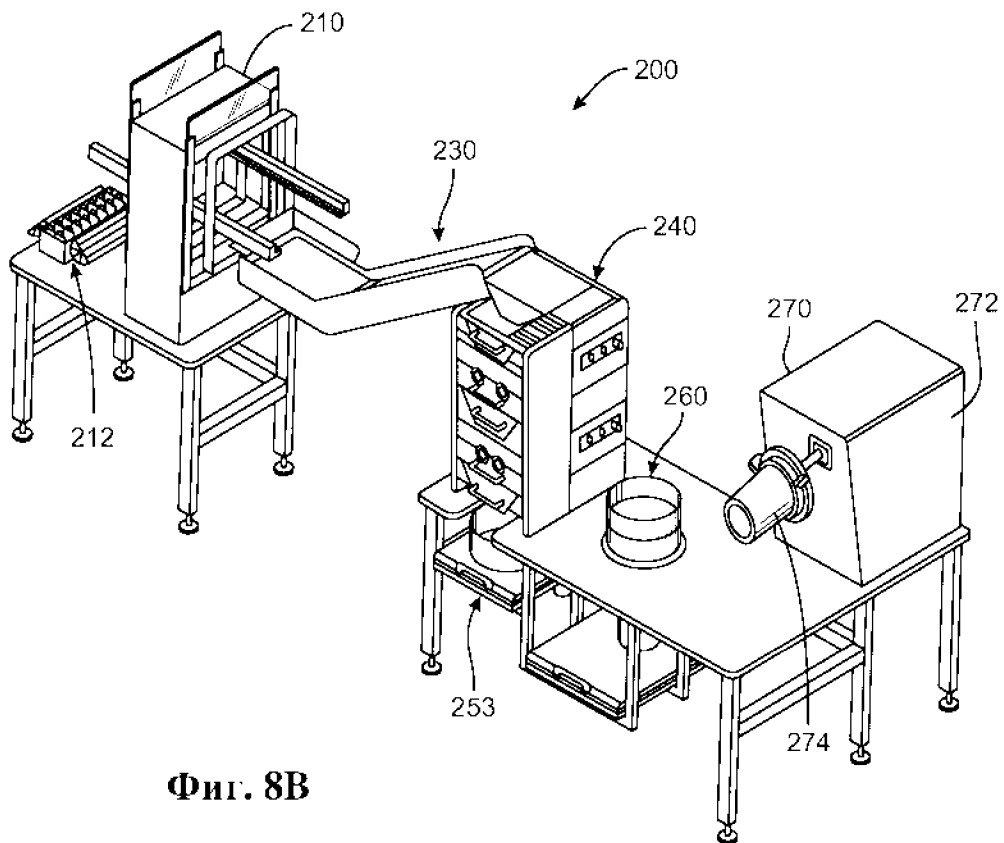


Фиг. 6

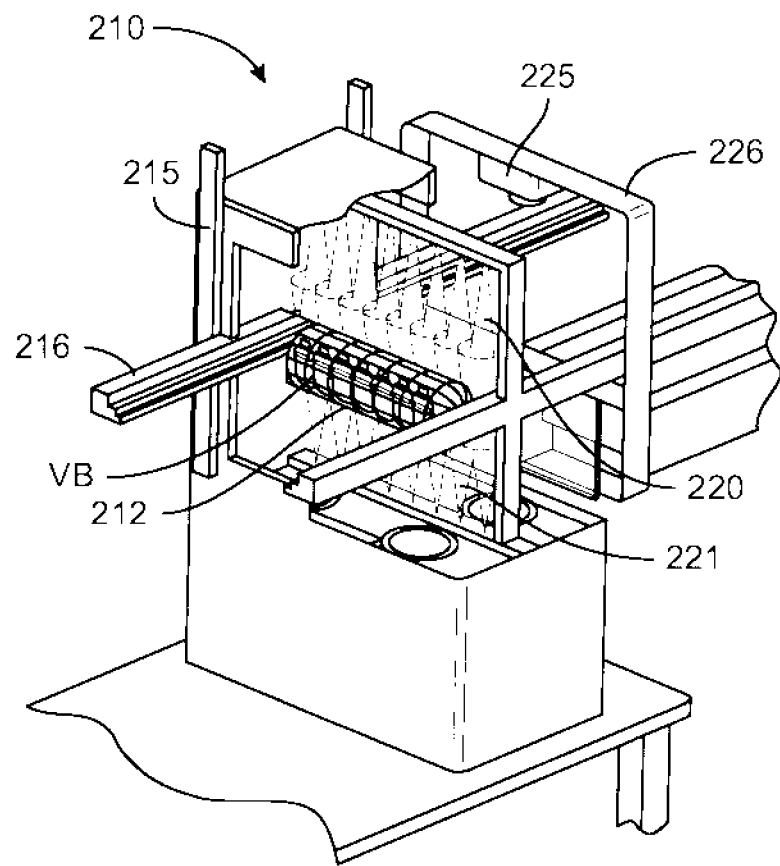
Стадия процесса**Фиг. 7**



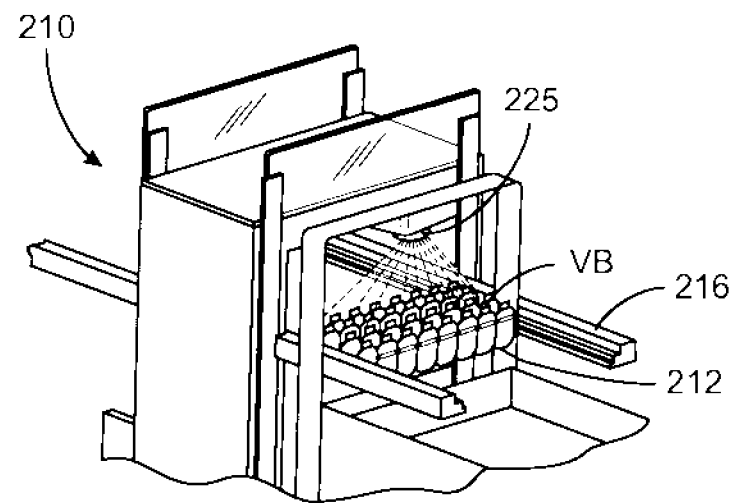
Фиг. 8А



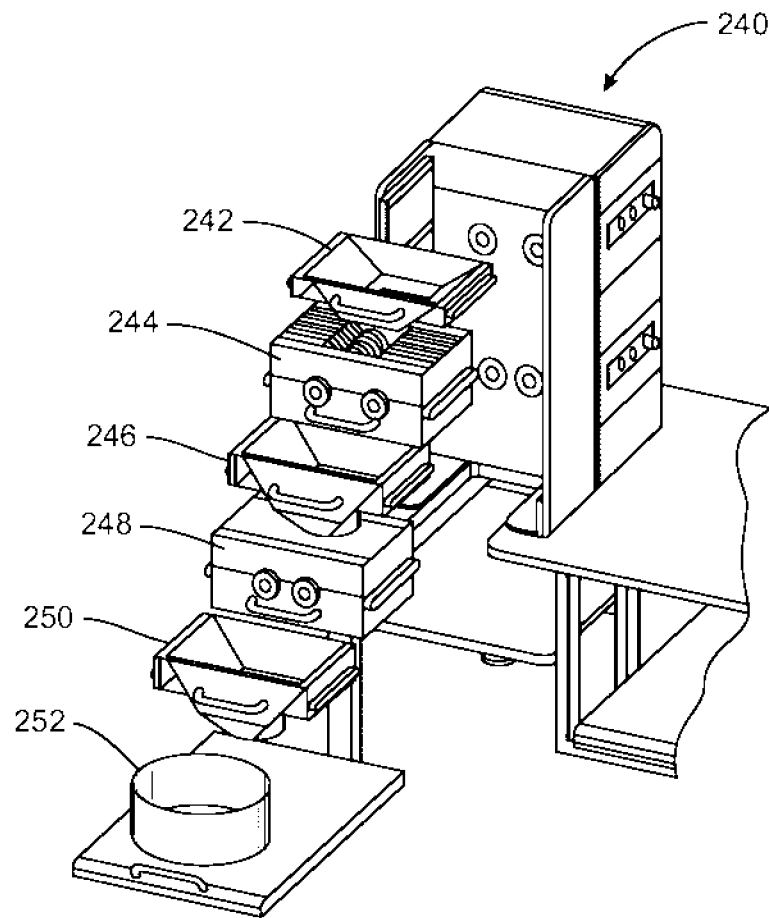
Фиг. 8В



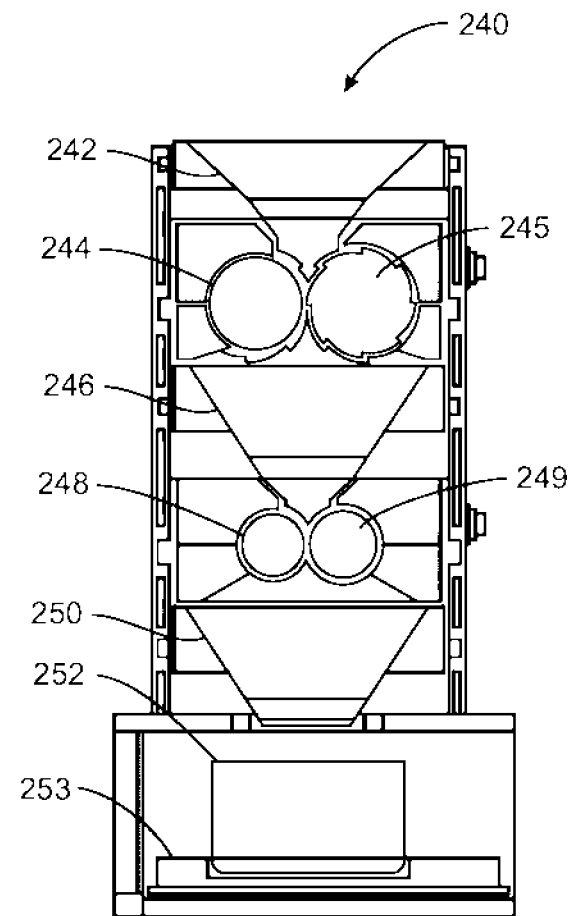
Фиг. 9А



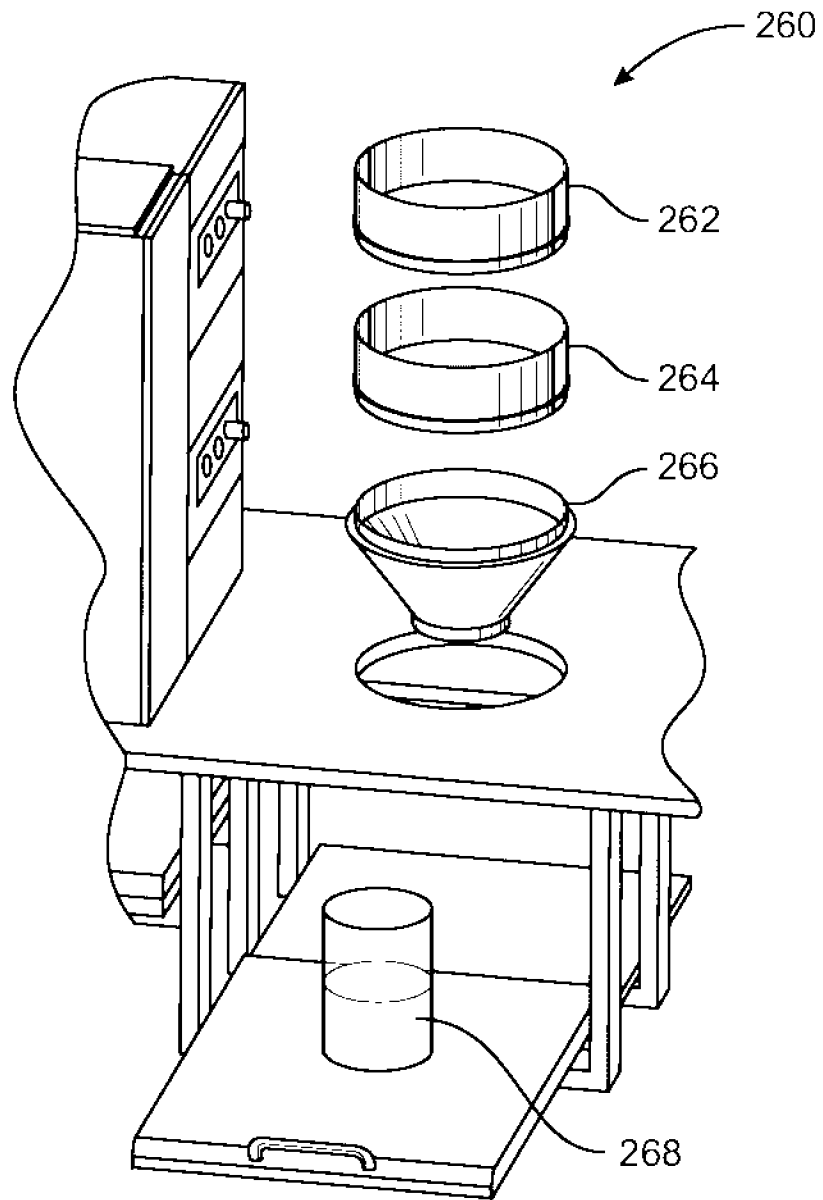
Фиг. 9В



Фиг. 10А



Фиг. 10В



Фиг. 11

Без охлаждения тела: ВСТ является постоянным = 0 часов, WIT и CIT варьируют от своих наблюдаемых минимального до максимального значений

WIT	CIT=8,93		CIT=18,00		CIT=24,32		CIT=35,84		CIT=67,75	
	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия
0,05	94,09%	8,98	88,54%	18,05	84,75%	24,37	80,90%	35,89	94,80%	67,80
0,51	94,03%	9,44	88,44%	18,51	84,63%	24,83	80,75%	36,35	94,75%	68,30
0,97	93,97%	9,90	88,34%	18,97	84,51%	25,29	80,61%	36,81	94,70%	68,80
1,43	93,92%	10,36	88,24%	19,43	84,38%	25,75	80,46%	37,27	94,64%	69,30
1,89	93,86%	10,82	88,14%	19,89	84,25%	26,21	80,31%	37,73	94,59%	69,80
2,35	93,80%	11,28	88,04%	20,35	84,13%	26,67	80,16%	38,19	94,54%	70,47
2,81	93,73%	11,74	87,94%	20,81	84,00%	27,13	80,01%	38,65		
3,27	93,67%	12,20	87,83%	21,27	83,87%	27,59	79,86%	39,11		
3,73	93,61%	12,66	87,73%	21,73	83,74%	28,05	79,71%	39,57		
4,19	93,55%	13,12	87,63%	22,19	83,61%	28,51	79,56%	40,03		
4,65	93,49%	13,58	87,52%	22,65	83,48%	28,97	79,40%	40,49		
5,11	93,42%	14,04	87,42%	23,11	83,35%	29,43	79,25%	40,95		
5,57	93,36%	14,50	87,31%	23,57	83,22%	29,89	79,09%	41,41		
6,03	93,30%	14,96	87,20%	24,03	83,09%	30,35	78,94%	41,87		
6,49	93,23%	15,42	87,09%	24,49	82,95%	30,81	78,78%	42,33		
6,95	93,17%	15,88	86,98%	24,95	82,82%	31,27	78,62%	42,79		
7,41	93,10%	16,34	86,87%	25,41	82,68%	31,73	78,47%	43,25		
7,87	93,03%	16,80	86,76%	25,87	82,55%	32,19	78,31%	43,71		
8,33	92,97%	17,26	86,65%	26,33	82,41%	32,65	78,15%	44,17		
8,79	92,90%	17,72	86,54%	26,79	82,27%	33,11	77,99%	44,63		
9,25	92,83%	18,18	86,43%	27,25	82,13%	33,57	77,82%	45,09		
9,71	92,77%	18,64	86,32%	27,71	81,99%	34,03	77,66%	45,55		
10,17	92,70%	19,10	86,20%	28,17	81,85%	34,49	77,50%	46,01		
10,63	92,63%	19,56	85,38%	28,63	81,71%	34,95	77,34%	46,47		
11,09	92,56%	20,02	85,27%	29,09	81,57%	35,41	77,17%	46,93		
11,55	92,49%	20,48	85,15%	29,55	81,43%	35,87	77,01%	47,39		
12,01	92,42%	20,94	85,04%	30,01	81,28%	36,33	76,84%	47,85		
12,47	92,35%	21,40	84,92%	30,47	81,14%	36,79	76,67%	48,31		
12,93	92,27%	21,86	84,81%	30,93	81,00%	37,25	76,50%	48,77		
13,40	92,20%	22,33	84,69%	31,40	80,85%	37,72	76,33%	49,24		

Фиг. 12А

С охлаждением тела: WTT является постоянным на своем минимуме = 0,05 часа, BCT и CTT варьируют от своих наблюдаемых минимального до максимального значений

CTT	BCT=1,07		BCT=1,62		BCT=2,20		BCT=3,39		BCT=6,00	
	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия
7,40	93,74%	8,52	93,11%	9,07	92,43%	9,65	90,98%	10,84	87,80%	13,45
8,90	92,80%	10,02	92,10%	10,57	91,34%	11,15	89,73%	12,34	86,22%	14,95
10,40	91,82%	11,52	91,04%	12,07	90,20%	12,65	88,42%	13,84	84,57%	16,45
11,90	90,78%	13,02	89,93%	13,57	89,01%	14,15	87,07%	15,34	82,89%	17,95
13,40	89,72%	14,52	88,79%	15,07	87,78%	15,65	85,68%	16,84	81,17%	19,45
13,55	89,61%	14,67	88,67%	15,22	87,66%	15,80	85,53%	16,99	81,00%	19,60
14,90	88,63%	16,02	87,62%	16,57	86,53%	17,15	84,27%	18,34	79,45%	20,95
16,40	87,52%	17,52	86,44%	18,07	85,28%	18,65	82,85%	19,84	77,74%	22,45
17,90	86,42%	19,02	85,27%	19,57	84,03%	20,15	81,45%	21,34	76,07%	23,95
19,40	85,34%	19,62	84,11%	20,17	82,80%	20,75	80,08%	21,94	74,44%	24,55
20,90	84,28%	20,52	82,99%	21,07	81,60%	21,65	78,76%	22,84	72,89%	25,45
22,40	83,26%	20,63	81,91%	21,18	80,46%	21,76	77,50%	22,95	71,42%	25,56
23,90	82,29%	22,02	80,89%	22,57	79,39%	23,15	76,31%	24,34	70,04%	26,95
25,40	81,39%	23,52	79,94%	24,07	78,38%	24,65	75,22%	25,84	68,78%	28,45
26,90	80,57%	25,02	79,07%	25,57	77,47%	26,15	74,22%	27,34	67,65%	29,95
28,40	79,83%	25,84	78,29%	26,39	76,66%	26,97	73,33%	28,16	66,64%	30,77
29,90	79,19%	26,52	77,62%	27,07	75,95%	27,65	72,56%	28,84	65,77%	31,45
31,40	78,65%	28,02	77,05%	28,57	75,35%	29,15	71,92%	30,34	65,05%	32,95
32,90	78,22%	29,52	76,60%	30,07	74,88%	30,65	71,41%	31,84	64,48%	34,45
34,40	77,91%	31,02	76,27%	31,57	74,53%	32,15	71,03%	33,34	64,06%	35,95
35,90	77,71%	32,52	76,06%	33,07	74,31%	33,65	70,79%	34,84	63,79%	37,45
37,40	77,62%	32,73	75,97%	33,28	74,22%	33,86	70,70%	35,05	63,69%	37,66
38,90	77,66%	34,02	76,01%	34,57	74,27%	35,15	70,74%	36,34	63,74%	38,95
40,40	77,82%	35,52	76,18%	36,07	74,44%	36,65	70,93%	37,84	63,94%	40,45
41,90	78,09%	37,02	76,47%	37,57	74,74%	38,15	71,25%	39,34	64,31%	41,95

Фиг. 12В

С охлаждением тела: СІТ является постоянным на своем минимуме = 7,4 часа, ВСТ и WIT варьируют от своих наблюдаемых минимального до максимального значений

ВСТ	WIT=0,05		WIT=1,95		WIT=2,48		WIT=3,30		WIT=8,95	
	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия	% жизнеспособных CD34	Полная ишемия
1,07	93,74%	8,52	93,49%	10,42	93,41%	10,95	93,30%	11,77	92,47%	17,42
1,81	92,89%	9,26	92,61%	11,16	92,53%	11,69	92,40%	12,51	91,49%	18,16
2,55	92,01%	10,00	91,70%	11,90	91,61%	12,43	91,47%	13,25	90,47%	18,90
3,29	91,10%	10,74	90,76%	12,64	90,67%	13,17	90,52%	13,99	89,43%	19,64
4,03	90,19%	11,48	89,82%	13,38	89,72%	13,91	89,56%	14,73	88,38%	20,38
4,77	89,28%	12,22	88,88%	14,12	88,77%	14,65	88,60%	15,47	87,34%	21,12
5,51	88,38%	12,96	87,96%	14,86	87,84%	15,39	87,66%	16,21	86,31%	21,86
6,25	87,51%	13,70	87,06%	15,60	86,94%	16,13	86,74%	16,95	85,33%	22,60
6,99	86,68%	14,44	86,21%	16,34	86,08%	16,87	85,87%	17,69	84,39%	23,34
7,73	85,90%	15,18	85,41%	17,08	85,27%	17,61			83,51%	24,08
8,47	85,18%	15,92	84,67%	17,82	84,53%	18,35				
9,21	84,53%	16,66	84,01%	18,56	83,86%	19,09				
9,95	83,97%	17,40	83,43%	19,30	83,28%	19,83				
10,69	83,50%	18,14	82,95%	20,04	82,80%	20,57				
11,43	83,12%	18,88	82,57%	20,78	82,41%	21,31				
12,17	82,85%	19,62	82,29%	21,52	82,13%	22,05				
12,91	82,69%	20,36	82,12%	22,26						
13,65	82,63%	21,10								
14,39	82,68%	21,84								
15,13	82,84%	22,58								
15,87	83,11%	23,32								
16,61	83,48%	24,06								
17,35	83,94%	24,80								
18,09	84,50%	25,54								
18,83	85,14%	26,28								
19,57	85,85%	27,02								
20,31	86,63%	27,76								
21,05	87,46%	28,50								
21,79	88,33%	29,24								
22,50	89,19%	29,95								

Фиг. 12С

Без охлаждения тела: ВСТ = 0 часов, WIT и CIT варьируют от своих наблюдаемых минимального до максимального значений

WIT	CIT=11,70		CIT=23,75		CIT=27,41		CIT=39,75		CIT=67,75	
	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия
1,08	693,630	12,78	639,001	24,83	622,416	28,49	566,465	40,83	439,527	68,83
1,83	686,798	13,53	632,170	25,58	615,585	29,24	559,634	41,58	432,696	69,58
2,58	679,967	14,28	625,339	26,33	608,754	29,99	552,803	42,33	425,865	70,33
3,33	673,136	15,03	618,507	27,08	601,922	30,74	545,972	43,08		
4,08	666,305	15,78	611,676	27,83	595,091	31,49	539,140	43,83		
4,83	659,474	16,53	604,845	28,58	588,260	32,24	532,309	44,58		
5,58	652,642	17,28	598,014	29,33	581,429	32,99	525,478	45,33		
6,33	645,811	18,03	591,183	30,08	574,598	33,74	518,647	46,08		
7,08	638,980	18,78	584,351	30,83	567,766	34,49	511,816	46,83		
7,83	632,149	19,53	577,520	31,58	560,935	35,24	504,984	47,58		
8,58	625,318	20,28	570,689	32,33	554,104	35,99	498,153	48,33		
9,33	618,486	21,03	563,858	33,08	547,273	36,74	491,322	49,13		
10,08	611,655	21,78	557,027	33,83	540,442	37,49				
10,83	604,824	22,53	550,195	34,58	533,610	38,24				
11,58	597,993	23,28	543,364	35,33	526,779	38,99				
12,33	591,162	24,03	536,533	36,08	519,948	39,74				
13,40	581,416	25,10	526,787	37,15	510,202	40,81				

Фиг. 13А

С охлаждением тела: WIT является постоянным на своем минимуме (0,05 часа), ВСТ и СІТ варьируют от своих наблюдаемых минимального до максимального значений

СІТ	ВСТ=1,07		ВСТ=6,54		ВСТ=9,78		ВСТ=15,00		ВСТ=22,50	
	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия
7,40	624,773	8,52	248,787	13,99	123,613	17,23	74,566	22,45	333,801	29,95
8,90	617,973	10,02	241,987	15,49	116,813	18,73			327,001	31,45
10,40	611,173	11,52	235,187	16,99	110,012	20,23			320,201	32,95
11,90	604,372	13,02	228,386	18,49	103,212	21,73			313,400	34,45
13,40	597,572	14,52	221,586	19,99	96,412	23,23			306,600	35,95
14,90	590,772	16,02	214,786	21,49					299,800	37,45
16,40	583,972	17,52	207,986	22,99					293,000	38,95
17,90	577,171	19,02	201,185	24,49					286,199	40,45
19,40	570,371	20,52	194,385	25,99					279,399	41,95
20,90	563,571	22,02	187,585	27,49						
22,40	556,771	23,52	180,785	28,99						
23,90	549,970	25,02	173,984	30,49						
25,40	543,170	26,52	167,184	31,99						
26,90	536,370	28,02								
28,40	529,570	29,52								
29,90	522,769	31,02								
31,40	515,969	32,52								
32,90	509,169	34,02								
34,40										
35,90										
37,40										
38,90										
41,03										

Фиг. 13В

С охлаждением тела: СИТ является постоянным на своем минимальном значении = 7,4 часа, ВСТ и WIT варьируют от своих наблюдаемых минимального до максимального значений

ВСТ	WIT=0,05		WIT=1,96		WIT=2,48		WIT=3,42		WIT=8,95	
	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия
1,07	624,77	8,52	607,38	10,43	602,64	10,95	594,08	11,89	543,71	17,42
2,07	540,59	9,52	523,19	11,43	518,46	11,95			459,53	18,42
3,07	463,32	10,52	445,92	12,43	441,18	12,95			382,25	19,42
4,07	392,96	11,52	375,56	13,43	370,82	13,95			311,89	20,42
5,07	329,51	12,52	312,11	14,43	307,37	14,95			248,44	21,42
6,07	272,97	13,52	255,57	15,43	250,84	15,95			191,91	22,42
7,07	223,35	14,52	205,95	16,43	201,21	16,95				
8,07	180,64	15,52	163,24	17,43	158,50	17,95				
9,07	144,83	16,52	127,44	18,43	122,70	18,95				
10,07	115,95	17,52								
11,07	93,97	18,52								
12,07	78,91	19,52								
13,07	70,76	20,52								
14,07	69,52	21,52								
15,07	75,19	22,52								
16,07	87,77	23,52								
17,07	107,27	24,52								
18,07	133,68	25,52								
19,07	167,00	26,52								
20,07	207,23	27,52								
21,07	254,37	28,52								
22,50	333,80	29,95								

Фиг. 13С

Без охлаждения тела: ВСТ является постоянным = 0 часов, WIT и СИТ варьируют от своих наблюдаемых минимального до максимального значений

WIT	СИТ=11,70		СИТ=23,75		СИТ=27,00		СИТ=40,50		СИТ=67,75	
	КОЕ-ГЭМ	Полная ишемия	КОЕ-ГЭМ	Полная ишемия	КОЕ-ГЭМ	Полная ишемия	КОЕ-ГЭМ	Полная ишемия	КОЕ-ГЭМ	Полная ишемия
1,08	96,457	12,78	97,503	24,58	97,814	28,08	99,012	41,58	101,429	68,83
1,68	91,589	13,38	92,636	25,18	92,946	28,68	94,144	42,18	96,561	69,43
2,28	86,721	13,98	87,768	25,78	88,078	29,28	89,276	42,78	91,694	70,03
2,88	81,853	14,58	82,900	26,38	83,211	29,88	84,408	43,38	86,826	70,63
3,48	76,985	15,18	78,032	26,98	78,343	30,48	79,541	43,98	81,958	71,23
4,08	72,118	15,78	73,165	27,58	73,475	31,08	74,673	44,58	77,090	71,83
4,68	67,250	16,38	68,297	28,18	68,607	31,68	69,805	45,18		
5,28	62,382	16,98	63,429	28,78	63,740	32,28	64,937	45,78		
5,88	57,514	17,58	58,561	29,38	58,872	32,88	60,069	46,38		
6,48	52,647	18,18	53,693	29,98	54,004	33,48	55,202	46,98		
7,08	47,779	18,78	48,826	30,58	49,136	34,08	50,334	47,58		
7,68	42,911	19,38	43,958	31,18	44,268	34,68	45,466	48,18		
8,28	38,043	19,98	39,090	31,78	39,401	35,28	40,598	48,78		
8,88	33,175	20,58	34,222	32,38	34,533	35,88	35,731	49,38		
9,48	28,308	21,18	29,355	32,98	29,665	36,48	30,863	49,98		
10,08	23,440	21,78	24,487	33,58	24,797	37,08	25,995	50,58		
10,68	18,572	22,38	19,619	34,18	19,930	37,68	21,127	51,18		
11,28	13,704	22,98	14,751	34,78	15,062	38,28	16,260	51,78		
11,88	8,837	23,58	9,884	35,38	10,194	38,88	11,392	52,38		
12,48	3,969	24,18	5,016	35,98	5,326	39,48	6,524	52,98		
13,04	0,000	24,74	0,473	36,54	0,783	40,04	1,981	53,54		

Фиг. 14А

С охлаждением тела: WIT является постоянным на своем минимальном значении = 0,05 часа, ВСТ и СІТ варьируют от своих наблюдаемых минимального до максимального значений

СІТ	ВСТ=1,07		ВСТ=6,04		ВСТ=9,78		ВСТ=13,90		ВСТ=22,50	
	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия
7,40	98,515	8,52	71,035	13,49	50,355	17,23	27,575	21,35	0,00	29,95
8,40	98,604	9,52	71,123	14,49	50,444	18,23	27,663	22,35	0,00	30,95
9,40	98,692	10,52	71,212	15,49	50,533	19,23	27,752	23,35	0,00	31,95
10,40	98,781	11,52	71,301	16,49	50,621	20,23	27,841	24,35	0,00	32,95
11,40	98,870	12,52	71,389	17,49	50,710	21,23	27,929	25,35	0,00	33,95
12,40	98,959	13,52	71,478	18,49	50,799	22,23	28,018	26,35	0,00	34,95
13,40	99,047	14,52	71,567	19,49	50,887	23,23	28,107	27,35	0,00	35,95
14,40	99,136	15,52	71,656	20,49	50,976	24,23	28,196	28,35	0,00	36,95
15,40	99,225	16,52	71,744	21,49	51,065	25,23	28,284	29,35		
16,40	99,314	17,52	71,833	22,49	51,154	26,23	28,373	30,35		
17,40	99,402	18,52	71,922	23,49	51,242	27,23	28,462	31,35		
18,40	99,491	19,52	72,010	24,49	51,331	28,23	28,550	32,35		
19,40	99,580	20,52	72,099	25,49	51,420	29,23	28,639	33,35		
20,40	99,668	21,52	72,188	26,49	51,508	30,23	28,728	34,35		
21,40	99,757	22,52	72,277	27,49	51,597	31,23	28,817	35,35		

Фиг. 14В

С охлаждением тела: СИГ является постоянным на своем минимальном значении = 7,4 часа, ВСГ и WIT варьируют от своих наблюдаемых минимального до максимального значений

ВСГ	WIT=0,05		WIT=0,10		WIT=1,54		WIT=1,92		WIT=2,49	
	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия	Общее кол-во КОЕ	Полная ишемия
1,07	98,52	8,52	98,11	8,57	86,43	10,01	83,34	10,39	78,72	10,96
2,07	92,99	9,52	92,58	9,57	80,90	11,01	77,81	11,39	73,19	11,96
3,07	87,46	10,52	87,05	10,57	75,37	12,01	72,29	12,39	67,66	12,96
4,07	81,93	11,52	81,52	11,57	69,84	13,01	66,76	13,39	62,13	13,96
5,07	76,40	12,52	75,99	12,57	64,31	14,01	61,23	14,39	56,60	14,96
6,07	70,87	13,52	70,46	13,57	58,78	15,01	55,70	15,39	51,07	15,96
7,07	65,34	14,52	64,93	14,57	53,25	16,01	50,17	16,39	45,54	16,96
8,07	59,81	15,52	59,40	15,57	47,72	17,01	44,64	17,39	40,01	17,96
9,07	54,28	16,52	53,88	16,57	42,19	18,01	39,11	18,39	34,49	18,96
10,07	48,75	17,52	48,35	17,57	36,66	19,01	33,58	19,39	28,96	19,96
11,07	43,22	18,52	42,82	18,57	31,13	20,01	28,05	20,39		
12,07	37,69	19,52	37,29	19,57	25,60	21,01	22,52	21,39		
13,07	32,16	20,52	31,76	20,57	20,08	22,01	16,99	22,39		
14,07	26,63	21,52	26,23	21,57	14,55	23,01	11,46	23,39		
15,07	21,11	22,52	20,70	22,57	9,02	24,01	5,93	24,39		
16,07	15,58	23,52	15,17	23,57	3,49	25,01	0,40	25,39		
17,07	10,05	24,52	9,64	24,57	0,00	26,01	0,00	26,39		
18,07	4,52	25,52	4,11	25,57	0,00	27,01	0,00	27,39		
19,07	0,00	26,52	0,00	26,57	0,00	28,01	0,00	28,39		
20,07	0,00	27,52	0,00	27,57	0,00	29,01	0,00	29,39		
21,07	0,00	28,52	0,00	28,57	0,00	30,01				
22,50	0,00	29,52	0,00	30,00	0,00	31,44				

Фиг. 14С

Время холодной ишемии (часы)

	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
1	90%	89%	88%	88%	87%	86%	86%	85%	84%	84%	83%	82%	82%	81%	81%	80%	80%	80%	79%	79%	79%	78%	78%	78%	78%	78%	78%	78%	
2	89%	89%	88%	87%	86%	86%	85%	84%	84%	83%	82%	82%	81%	81%	80%	80%	79%	79%	79%	78%	78%	78%	78%	78%	78%	78%	78%	78%	
3	89%	89%	87%	87%	86%	85%	85%	84%	83%	83%	82%	81%	81%	80%	80%	79%	79%	78%	78%	78%	78%	77%	77%	77%	77%	77%	77%	77%	
4	89%	88%	88%	86%	86%	85%	84%	83%	83%	82%	81%	81%	80%	80%	79%	79%	78%	78%	77%	77%	77%	77%	77%	76%	76%	76%	76%	76%	
5	88%	87%	87%	86%	85%	84%	84%	83%	82%	82%	81%	80%	80%	79%	79%	78%	78%	77%	77%	77%	76%	76%	76%	76%	75%	76%	75%	76%	75%
6	88%	87%	86%	86%	85%	84%	83%	83%	82%	81%	80%	80%	79%	79%	78%	78%	77%	77%	76%	76%	76%	75%	75%	75%	75%	75%	75%	75%	75%
7	87%	87%	86%	85%	84%	84%	83%	82%	81%	81%	80%	79%	79%	78%	77%	77%	76%	76%	76%	76%	75%	75%	75%	75%	74%	74%	74%	74%	74%
8	87%	86%	85%	85%	84%	83%	82%	82%	81%	80%	79%	79%	78%	77%	77%	76%	76%	75%	75%	75%	74%	74%	74%	74%	74%	74%	74%	74%	74%
9	87%	86%	85%	84%	83%	83%	82%	81%	80%	79%	79%	78%	77%	77%	76%	76%	75%	75%	74%	74%	74%	74%	73%	73%	73%	73%	73%	73%	73%
10	86%	85%	85%	84%	83%	82%	81%	80%	80%	79%	78%	77%	77%	76%	76%	75%	75%	74%	74%	73%	73%	73%	73%	73%	73%	72%	72%	72%	72%

Время тепловой ишемии (часы)

Фиг. 15